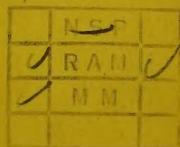


Vol. 25

1958

ARQUIVOS DO INSTITUTO BIOLÓGICO

• Departamento de Defesa Sanitária da Agricultura •



SECRETARIA DA AGRICULTURA
SÃO PAULO
BRASIL



Os Arquivos do Instituto Biológico aparecem sob a forma de artigos separados publicados à medida de sua apresentação, os quais anualmente são reunidos em um volume, que pode ser adquirido por permuta ou compra pelo preço marcado na capa.

Os artigos separados, impressos em número limitado, poderão ser adquiridos ao preço de Cr\$ 20,00 no Serviço de Vendas do Instituto Biológico.

Tôda a correspondência referente aos Arquivos deve ser dirigida ao Diretor Geral do Instituto Biológico, (Departamento de Defesa Sanitária da Agricultura) Caixa postal 7119, São Paulo, Brasil.

Diretor Geral: Paulo Nóbrega

The "Arquivos do Instituto Biológico" appear in the form of separate articles published as they are presented, and are annually united in one volume, which may be acquired by exchange or purchase at the price indicated on the cover.

The separate articles may be purchased for US \$ 0.20 from the Serviço de Vendas of the Instituto Biológico.

All correspondence referring to the "Arquivos" should be addressed to - Diretor Geral do Instituto Biológico, P. O. Box 7119, São Paulo, Brazil.

PREÇO DÊSTE NÚMERO Cr\$ 150,00

1934

1959



Jubileu de Prata

O Instituto Biológico de São Paulo, Instituição Complementar da Universidade de São Paulo, congratula-se pelo transcurso, em 1959, do 25.º aniversário da fundação desta Universidade e apresenta uma homenagem aos homens públicos e aos mestres que concretizaram esta obra.



"a organização e o desenvolvimento da cultura filosófica, científica, literária e artística constituem as bases em que se assentam a liberdade e a grandeza de um povo"

(Trecho do Decreto 6.283 de 25-I-1934, assinado pelo Interventor Federal Armando de Salles Oliveira, criador da Universidade de São Paulo).

ARQUIVOS
DO
INSTITUTO BIOLÓGICO

• Departamento de Defesa Sanitária da Agricultura •



SECRETARIA DA AGRICULTURA
SÃO PAULO
BRASIL

S U M Á R I O

	Págs.
1. Pereira, C. — TRAÇOS BIOGRÁFICOS DE JOÃO PEREIRA JUNIOR (1912-1958)	1-12
2. Almeida, W. F. de — VIDA CIENTÍFICA DE CLEMENTE PEREIRA	13-23
3. Fonseca, J. P. da — <i>MIGDOLUS MORRETESI</i> LANE (COLEÓPTERA ANOPLODERMIDAE) — UMA BROCA EVENTUAL DA CANA DE AÇÚCAR E DO EUCALÍPTO. Com as estampas 1 a 4. <i>An occasional borer of sugar-cane and eucalyptus</i>	29-40
4. Castro, M. P. de, Mello, D. de & Queiroz, J. C. de — MULTIPLICAÇÃO E EFEITO CITOPATOGÊNICO DO VÍRUS DA FEBRE AFTOSA EM CULTURA DE TECIDO RENAL. Com 6 tabelas. <i>Multiplication and cytopathogenic effect of the foot-and-mouth disease virus in kidney culture</i>	41-53
5. Meyer, J. R. — ATIVIDADE ANTITUMORÍGENA DOS LÍQUIDOS DE CULTURA DO FUNGO " <i>BEAUVERIA BASSIANA</i> ", DEMONSTRADA "IN VITRO" SOBRE O ADENOCARCINOMA TRANSPLANTÁVEL DO CAMUNDONGO. Com as estampas 5 e 6. <i>Antineoplastic activity of a culture medium where the fungus "Beauveria bassiana" had grown, against a transplantable adenocarcinoma of the mouse</i>	59 54-82
6. Meyer, J. R. — POSSIBILIDADE DE IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS CONTRA A INOCULAÇÃO DO ADENOCARCINOMA TRANSPLANTÁVEL PELO EMPREGO DE MATERIAL TRATADO PELO LÍQUIDO DE CULTURA DE <i>BEAUVERIA BASSIANA</i> . <i>Immunization of mice against a transplantable adenocarcinoma by means of tumor tissues treated by a culture medium where the fungus "Beauveria bassiana" had grown</i>	63-66

(CONTINUA)

	Págs.
7. Amaral, J. F. do — CARACTERES BIOQUÍMICOS DO <i>XANTHOMONAS MANIHOTIS</i> E <i>X. RUBRISUBALBICANS</i> E SUAS POSIÇÕES NA CHAVE DE BURKHOLDER (<i>SCHIZOMYCETES, PSEUDOMONADACEAE</i>). <i>Biochemical characters of Xanthomonas manihotis and X. rubrisubalbicans; their positions in Burkholder's 1957, key for the genus. (Schizomycetes, Pseudomonadaceae)</i>	67-72
8. Guida, V. O. — IDENTIFICAÇÃO SOROLÓGICA DE AMOSTRAS DE <i>LEPTOSPIRA</i> (<i>L. HYOS</i>), ISOLADAS DE SUÍNOS. <i>Sorological identification of strains of Leptospira (L. hyos), isolated of swine.</i>	73-75
9. Guida, V. O. & Forster, J. P. — SÍNTESE DA RIBOFLAVINA PELO <i>B. POLYMYXA</i> . — EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE SUSPENSÕES DESSE MICROORGANISMO POR VIA ORAL, A RATOS EM AVITAMINOSE EXPERIMENTAL. Com a estampa 7. <i>Studies on the riboflavin synthesis by B. polymyxa. Effects of administration of suspension of B. polymyxa, by oral route, to rats subjected to experimental avitaminosis</i>	77-82
10. Meneghini, M. — O EMPREGO DE DISCOS DE FÓLHAS DE <i>NICOTIANA GLUTINOSA</i> PARA DETERMINAR A ATIVIDADE DAS SUSPENSÕES DE VÍRUS DO MOSAICO DO FUMO. <i>Use of leaf-disks of Nicotiana glutinosa to determine activity of tobacco mosaic virus suspensions</i>	83-93
11. Almeida, N. F. & Piedade, J. R. — ANÁLISE DOS INSETICIDAS FOSFORADOS. <i>Phosphorous insecticides analysis</i>	95-107
12. Heinrich, W. O. — EXPERIÊNCIAS PARA COMBATE A <i>THECLA BASILIDES</i> (GEYER, 1837), BROCA DO ABACAXI (<i>LEPID. LYCAENIDAE</i>). <i>Experiments for the control of the pineapple borer Thecla basilides (GEYER, 1837), (Lepid. Lycaenidae)</i>	109-119
13. Pereira, C., Castro, M. P. de & Mello, D. de — INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA CUTÂNEA NO DESENVOLVIMENTO DE LESÕES LEISHMANIÓTICAS. Com 7 tabelas e as estampas 8 a 10. <i>On the influence of temperature on the development of Leishmania skin lesions</i>	121-138

14. **Caldas, A. D. & Nesti, A.** — Ocorrência da Brucelose caprina no Estado de São Paulo causada pela *Brucella abortus*. — Observações sobre um surto de caráter epizootico.
The occurrence of a natural infection in goats with Brucella abortus in São Paulo, Brazil. Observations on an epizootic outbreak 139-149
15. **Bueno, R. C.** — O edema da barbeta como única manifestação da cólera aviária e reprodução experimental da afecção. Com 2 tabelas.
The edema of the wattles as only evidence of fowl cholera and the experimental study of the disease. 151-160
16. **Pereira, H. F., Figueiredo Jr., E. R. de & Hussni, J.** — A cercosporiose da bananeira. — Sua ocorrência no Estado de São Paulo — Experiências e combate. Com as estampas 11 a 19.
Experiments to control the "Sigatoka Disease" — Cercospora musae ZIMM — in São Paulo 161-184
17. **Araújo, R. L.** — Contribuição a biogeografia dos térmitas de São Paulo, Brasil. *INSECTA — ISOPTERA*.
Contribution to the biogeography of the Termites of the State of São Paulo, Brazil 185-217
18. **Araújo, R. L.** — Contribuição a biogeografia dos térmitas de Minas Gerais, Brasil. *INSECTA — ISOPTERA*.
Contribution to the biogeography of the Termites of the State of Minas Gerais, Brazil 219-236
19. **Cardoso, D. M. & Almeida, W. F.** — Atividade vitamínica B_{12} no rumen e nas fezes de bovinos. Sua variação com o regime alimentar. Com as estampas 20 e 21.
Vitamin B_{12} activity in bovine rumen and feces. Its variation according the ration fed 237-252
20. **Glannotti, O.** — Estudos sobre o mecanismo de ação do Aldrin, Dieldrin, Isodrin e Endrin em *Periplaneta americana* (L.).
Studies on the mode of action of Aldrin, Dieldrin, Isodrin and Endrin in Periplaneta americana (L.) 253-259

TRAÇOS BIOGRÁFICOS DE JOÃO PEREIRA JUNIOR (1912-1958)

POR

Clemente Pereira

Do Departamento de Zoologia de São Paulo

Faleceu a 21 de fevereiro de 1958, inesperadamente, em São Paulo, S. P., o Dr. João Pereira Jr.. Nascido em São João da Bocaina, S. P., em 8 de janeiro de 1912, era filho do Sr. João Pereira e de Dona Jovina Barbosa Pereira (falecida).

EDUCAÇÃO — Fêz seu curso primário parte na cidade natal (1921) e parte na Capital do Estado (1922-24). O curso secundário realizou-se no Ginásio Nossa Senhora do Carmo (1924-27) e no Ginásio Coração de Jesus (1928), também na Capital. Fêz o curso médico (1931-36) na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Era segundo-anista do curso médico quando tomou parte na Revolução Constitucionalista de 1932.

FORMAÇÃO CIENTÍFICA — Sua formação científica fêz-se no Instituto Biológico da Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo, onde, ainda como estudante, começou a freqüentar voluntariamente o Laboratório de Fisiologia, a partir do mês de agosto de 1933, sob a orientação dos Profs. Paulo Enéas Galvão e Dorival Macedo Cardoso. No início de 1935 foi contratado como Técnico de Laboratório, passou a Subassistente Interino em 1936, sendo efetivado como Assistente Auxiliar em 1937, tornando-se Assistente em 1942. Com a aposentadoria do Prof. Paulo Enéas Galvão assumiu a chefia da Seção de Fisiologia Animal do Instituto Biológico em 1952, posto onde a morte o surpreendeu.

ATIVIDADES DIVERSAS — Paralelamente com sua carreira científica, dedicou-se também a outras atividades correlatas. Assim, na Escola Paulista de Medicina, foi Assistente Extranumerário da Cadeira de Fisiologia em 1939, passando a Assistente Efetivo em 1940. A partir de 1941 passou a reger interinamente a Cadeira de Química Fisiológica, da qual se tornou Assistente Substituto em 1942. Infelizmente, suas atividades didáticas cessaram com o pedido de demissão apresentado em 6 de novembro de 1942, à diretoria, em carta que é um modelo de ativez e de dignidade funcional.

Convidado a colaborar na feitura de "Biological Abstracts",

de Filadelfia, E. U. A., encarregou-se de fazer resumos dos artigos científicos da "Revista de la Asociacion Medica Argentina". De janeiro de 1946 até dezembro de 1957, remeteu 214 resumos para a prestigiosa fonte de informações bibliográficas, havendo seu trabalho merecido repetidas apreciações elogiosas, no gênero da do Editor John E. Flynn, em carta de 6 de outubro de 1948: "Your abstracting are very fine indeed. Your command of our difficult language is really excellent. We all genuinely appreciate your abstracting this journal for us".

Era sócio da Sociedade de Biologia de São Paulo, da qual foi eleito Tesoureiro em dezembro de 1942, e depois reeleito ininterruptamente até sua morte. Em 1956 tornou-se sócio fundador da Sociedade Brasileira de Fisiologia do Rio de Janeiro. Além disso, desde 1948 era Diretor da Seção de Contrôlo Biológico e Hormonal do "Instituto Organoterápico Brasileiro", posteriormente absorvido pelo "Laboratório Torres S. A.". Em janeiro de 1952 tornou-se membro da Subcomissão de Hormônios da Comissão de Padronização Farmacêutica. Nas horas vagas encontrava tempo ainda para exercer alguma clínica, no velho estilo do "médico-de-família", para o que havia se munido com meia dezena de cursos de especialização feitos nos melhores centros médicos de São Paulo.

PESQUISA CIENTÍFICA

Suas atividades no domínio científico foram multiformes, compreendendo tanto trabalhos de pesquisa fundamental como de aplicação.

OVULAÇÃO ARTIFICIAL EM PEIXES — Constituiu o início de seu adestramento científico, quando, como colaborador voluntário, teve ocasião de participar dos trabalhos em andamento no Instituto Biológico, sob a inspiração do saudoso Rodolpho von Ihering, interessado em forçar o amadurecimento da ova dos nossos peixes fluviais, condição essencial para a fecundação artificial, que seria a base da nossa piscicultura. O primeiro artigo (1) trata da ovulação de peixes maduros provocada por macerados de hipófise, e o segundo (2) comprova a atividade da hipófise dessecada.

VITAMINA B₁ E OXIDAÇÃO DO ÁCIDO LÁTICO — É uma seqüência de trabalhos orientados por Paulo Enéas Galvão, em torno do mecanismo da lesão química provocada pela avitaminose B₁ na zona motora central de aves e de mamíferos, e consistente em perturbação grave da oxidação do ácido láctico (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 16).

DESTRUIÇÃO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL — Em colaboração com Paulo Enéas Galvão, foi conseguida uma técnica elegante de destruição do sistema nervoso central em cães, por compressão com solução hipertônica de cloreto de sódio (10) explorada posteriormente nas suas principais aplicações experimentais (11, 12, 13, 14, 15).

POTENCIAÇÃO DA CONTRAÇÃO MUSCULAR — Seu primeiro artigo (17) versa sobre a potenciação dos abalos musculares após estiramento simples do músculo gastrocnêmio da cobaia, que mostrou ser da mesma ordem da contração que sucede a uma curta tetania. No outro artigo (21) estuda a potenciação pós-tetânica provocada por arsenito de sódio na cobaia, e que corroborou suas conclusões anteriores: haveria duas fases no fenômeno da potenciação — uma intensa e evanescente, imediatamente pós-tetânica, de natureza muito provavelmente química, e outra contínua e mais duradoura, de natureza possivelmente física. Ainda a respeito do assunto já estava com experimentação adiantada sobre a importância do nível de pressão isométrica na potenciação da contração muscular por estiramento em mamíferos, e sobre o papel da denervação motora prévia e da pressão sanguínea sobre o mesmo fenômeno, trabalhos que não chegaram a ser ultimados.

VAGOTOMIA ALTA BILATERAL NA COBAIA — O tema em aprêço ocupou particularmente a atenção do pesquisador desde começos de 1944, e já na I Reunião Conjunta das Sociedades de Biologia do Brasil, em 4 de setembro de 1946, apresentara um resumo da sua experimentação sobre centenas de cobaias, do mecanismo de cuja morte pode excluir a influência do peso e da idade, bem como dos fenômenos mecânicos pulmonares. Por outro lado, com os anestésicos depressores da atividade reflexa obtinha duplicação ou triplicação da sobrevida dos animais vagotomizados, concluindo que “várias causas que alterem profundamente o ritmo e a amplitude respiratória, podem levar a cobaia à morte com o quadro pulmonar final encontradiço na dupla vagotomia”, o que colocava o complexo problema em bases inteiramente novas. No seu primeiro artigo sobre o assunto (18) foi-lhe possível ampliar mais a análise do fenômeno, excluindo ainda a influência da irritabilidade dos troncos vagais, do esgotamento muscular e do nível de tonus neuro-muscular; permanecia como regulador da sobrevida, nessas condições, o grau de excitabilidade do sistema nervoso.

Depois de se familiarizar com as primeiras centenas de cobaias submetidas à experimentação, acabou por descobrir que havia nelas

mais do que manifestações pulmonares, mormente nos animais de sobrevida mais longa: eram ulcerações hemorrágicas agudas da mucosa do estômago, que às vezes perfuravam, e indistinguíveis das úlceras pépticas, o que foi objeto de seu último artigo científico (29), depois de apresentado na reunião de 27 de janeiro de 1957, na Seção de Temas Livres do III Seminário Paulista de Gastroenterologia, reunido em São Paulo. Para tais pesquisas idealizou um tipo de pletismógrafo corporal, que seria descrito em publicação ulterior, na qual trataria também dos novos resultados experimentais sobre a gênese das ulcerações gástricas por hiperventilação, com ou sem vagotomia. Reconheceu, então, que a hiperirritabilidade do sistema nervoso central, conseqüente à vagotomia bilateral, provocava intensa hiperventilação pulmonar, o verdadeiro agente das ulcerações do estômago. Chamou a atenção, ainda, do ponto de vista médico, para o fato dos fenômenos que acabava de descobrir mimetizarem com grande intensidade o quadro de hiperventilação encontrado em clínica nos pacientes tensos, ansiosos ou neuróticos, e emprestarem um apóio experimental ao fator "impacto psicológico", colocado recentemente entre os fatores de importância no síndrome da úlcera péptica, realçando, ainda, a relação entre a neurose de angústia e úlcera duodenal. Esse tema levou-o a vasta experimentação sobre a gênese de lesões ulcerosas gastroduodenais na cobaia e no rato, sob tensão nervosa sem anestesia, que já estava para ser escrito, e do qual restam muitas dezenas de estômagos fixados em distensão, ostentando as ulcerações obtidas nessas condições.

Outros aspectos, ainda, da sobrevida de mamíferos após vagotomia alta bilateral, que estava com a parte experimental praticamente concluída desde 1948, não chegaram a se transformar em artigos redigidos, como a influência da injeção de vários cátions na sobrevida de mamíferos, e o papel da vagotomia na regulação respiratória na cobaia e no rato.

TRABALHOS DE APLICAÇÃO MÉDICA — Além dos que acabam de ser citados, sobre as ulcerações gastroduodenais, um puramente clínico (19) foi a observação clínica sobre acidente encefalopático por sensibilidade intensa a uma droga anti-histamínica, e outro (20) foi um estudo experimental, no cão, da onda negativa inicial do complexo ventricular, por meio de derivações unipolares do eletrocardiograma.

ESTUDOS SOBRE A "MICELINA" — Sob esta denominação, procurou verificar experimentalmente a atividade analgésica de filtrado assético de meios líquidos onde se desenvolveram culturas de certos fun-

gos, fornecidos pelo Dr. Juvenal Ricardo Meyer, também do Instituto Biológico. Num primeiro artigo (23) demonstrou que a "micelina" não exerce efeito entorpecente ou anestésico de âmbito cortical, e num segundo (24), demonstrou que a "micelina" revela propriedades sedativas sobre a região bulbar, independentes de qualquer ação de anestésicos anteriormente usados.

ESTUDOS SOBRE ALIMENTAÇÃO — Publicou um único artigo sobre o assunto (22) em que revelou a existência no capim Angola de uma ação depressora da atividade oitóxica "in vitro", nas cobaias com êle alimentadas, que independia da idade dos animais e do seu estado fisiológico, e que mimetizava a atividade da progesterona. A propósito das relações entre a dieta e condições hormonais, tinha elaborado dois outros trabalhos que não chegou a concluir, e que apresentou na reunião de 11 de junho de 1949 da Sociedade de Biologia de São Paulo: dieta racional para a sobrevida de ratos adrenalectomizados; sobrevida de ratos adrenoprivos tratados por acetato de desoxicorticosterona, em função do teor de gordura da dieta, e mais o papel diabético do estilbestrol no rato e no coelho.

Além desses, havia iniciado uma investigação dos esteróides vegetais que poderiam ser precursores dos esteróides suprarrenais, havendo programado para o ano em que faleceu a detenção por cromatografia desses esteróides no plasma e na urina de animais sob diversas rações.

Ainda sobre alimentação de animais de laboratório, deixou inconcluso desde 1948, um trabalho sobre a influência de ácidos graxos insaturados no crescimento e aspecto de ratos mantidos em dieta vegetal, e com adição de farinhas animais.

O PROBLEMA DA BEBIDA FINA NO CAFÉ — Este problema, de vital importância para a economia do País, e já bem mais do que secular, foi abordado pelo pesquisador de um ângulo certo e com resultados exequíveis na prática. Assim foi-lhe possível transformar em café de boa bebida, cafés tradicionalmente menos valiosos do Vale do Paraíba. Partiu êle do princípio já estabelecido há muito, de que todo café maduro, em "cereja", é capaz de dar boa bebida, em contraste com o de varrição, e que é durante a fermentação natural do fruto que surgem as alterações de gosto, aspecto e peso que inferiorizam a maior parte do nosso principal produto de exportação.

Tornava-se fundamental a desgomagem rápida do café despolpado, para acelerar a secagem e evitar as fermentações que comunicavam ao grão o detestável gosto "duro", "riado" e "Rio" dos classificadores de café. O primeiro artigo que publicou sobre o assun-

to (25) deu conta de seus experimentos com as esterases pouco específicas do pâncreas e das glândulas salivares de ratos para a eliminação rápida da mucilagem que fica aderente ao pergaminho que envolve os grãos. Os resultados foram satisfatórios. Entretanto, os experimentos de contrôle, em que não se juntavam enzimas de origem animal, mas apenas se neutralizava a acidez do meio e se juntava um ativador de esterases, davam resultados perfeitamente comparáveis aos anteriores. Concluiu, então, "que nas condições de pH do meio e sob ativação de NaCl, nenhum fermento estranho é necessário adicionar à polpa do café maduro; aí estão presentes fermentos, que, convenientemente ativados podem liberar a mucilagem do grão de café, em temperatura ambiente, dentro de uma hora".

No segundo artigo de pesquisa sobre o assunto (27) explorou mais a fundo a desgomagem rápida por ativação das próprias enzimas do fruto, acertando as quantidades de álcali (cal extinta a 0,16%) e cloreto de sódio (sal de cozinha a 0,1%), que, durante uma hora, à temperatura ambiente, permitiam desgomar e secar até 8 lotes diários de café despulpado, com boa bebida.

Entusiasmado com os resultados obtidos com seu método de desgomagem pela ativação das enzimas naturais, divulgou o método em conferências realizadas em 15 de junho de 1956 no Auditório Rocha Lima do Instituto Biológico, na Capital, em 16 de julho de 1956 em Taubaté, sob o patrocínio do Rotary Club, da Associação Rural, da Casa da Lavoura e da Rádio Difusora locais, em 27 de setembro na Sociedade de Biologia de São Paulo, e em 29 de março de 1957 no Centro de Debates e Estudos Agronômicos de Piracicaba. Além disso, preparou dois artigos de divulgação (26, 28) para melhor difundir os resultados de suas pesquisas.

Entretanto, enxergou mais longe no problema do aproveitamento do café, achando que o grão poderia assumir o caráter de verdadeiro subproduto, desde que a polpa fôsse utilizada como alimento para o gado e aves e o pergaminho como fonte de celulose. Quando a morte o surpreendeu estava empenhado no estudo dos polifenóis da casca do café, extraídos a frio em água amoniacal e na separação desses compostos cíclicos por precipitação fracionada. Além disso, estava preparando mais um trabalho sobre a manutenção da coloração do café desgomado, por seu método rápido, em contraste com o descoramento progressivo, já conhecido, do café desgomado por fermentação lenta.

OUTROS TRABALHOS INACABADOS — Afora os trabalhos que deixou em andamento a propósito dos principais temas que abordou, há

uma miscelânea de pesquisas que foi deixando para trás premido pelas circunstâncias. Podem ser mencionados do seu relatório das atividades desenvolvidas em 1949, os seguintes itens: úlceras gastroduodenais no rato em relação com a acidose e jejum; insuficiência circulatória da veia porta em relação ao metabolismo de lípidos; fibrilação ventricular experimental e a ação de hormônios e de hidrocarbonetos; resistência animal ao fenol e ao cianeto, em relação com o tipo de alimentação. Trabalhos que estavam prontos para a redação final, dependendo de pormenores, em geral bibliográficos: importância para o homem da eliminação de azoto na atmosfera confinada de oxigênio, nos aparelhos de metabolismo de circuito fechado; significação para o nível de metabolismo, da tensão parcial de azoto circulante no sangue (em cães); sobrevida do centro respiratório na cobaia sob monóxido de carbono.

No seu relatório sobre o primeiro semestre de 1940 refere o tratamento das sarnas psoróptica e notoédrica do coelho por emulsão de óleo de urucu a 20 por cento (cura com 8 a 15 pulverizações em dias alternados), e com emulsão a 25 por cento de óleo de copaíba (cura com 2 a 3 pulverizações em dias alternados). Mais interessante prometia ser sua experimentação com o agente do mal-de-cadeiras (*Trypanosoma equinum*), como fator anemiante da cobaia, mas não agressor das hemácias, para estudo do centro regulador do número de glóbulos vermelhos em circulação, situado na região hipofisário-talâmica, pela técnica de Tore Broman, por meio de injeção intrarterial de azul de tripan, lavagem arterial por soro fisiológico, e depois formol: o ponto lesado aparecia em azul, o que conseguiu uma vez, nitidamente. Como esclarece: “estas tentativas foram muito prejudicadas por atividades de operários das obras do predio, seja na Seção de Fisiologia, seja na de Parasitologia”. Como a cepa de protozoário tivesse perdido a virulência, experimentou dividir 10 cobaias infectadas em dois lotes iguais, um mantido a 10° C, e outro a 38° C, durante 12 horas. As 5 cobaias em temperatura baixa tiveram a parasitemia ligeiramente aumentada, em contraste com as de temperatura elevada, de que sobreviveram apenas 2: estas estavam negativas para tripanossomos no sangue circulante, mas, devolvidas à temperatura ambiente, apresentaram dentro de 15 dias boa parasitemia, como se tratasse de nova infecção.

O DRAMA DE UM PESQUISADOR EM AMBIENTE CULTURALMENTE SUBDESENVOLVIDO — A história da Seção de Fisiologia Animal do Instituto Biológico que teve um período áureo, e depois foi sendo estrangulada progressivamente pela reiterada inópia governamental, é típi-

ca do que vem acontecendo há anos, em geral, com a pesquisa básica no Estado de São Paulo: um pesquisador se afasta por motivos particulares, outro falece, um terceiro se aposenta, e agora, o último desaparece prematuramente, deixando um vácuo nas pesquisas sôbre fisiologia animal no Instituto Biológico. Ninguém mais para continuar uma tradição científica de primeira ordem, que se interrompe tão melancolicamente, como se nada devêssemos às gerações futuras, ou se como os frutos da inteligência pudessem ser adquiridos no mercado internacional, à medida das necessidades ou vaidades governamentais, como nos povos tipicamente coloniais.

Nada mais oportuno do que transcrever as próprias palavras do malogrado pesquisador quando, no seu relatório sôbre as atividades durante o ano de 1949, depois de relacionar os temas que mereceram sua atenção, não consegue sopitar sua revolta contra a situação de desamparo e penúria de recursos para trabalhar a que se vê reduzido.

“São êstes os assuntos que temos procurado esclarecer experimentalmente, apesar da notória falta de material que se arrasta de ano para ano, obrigando o pesquisador a perder horas e horas de trabalho na adaptação, confecção, remodelação ou montagem de aparelhos, sabido como é, não dispor êste Instituto de marcenaria, funilaria e mecânica com pessoal habilitado a resolver problemas técnicos. Em parte pudemos sanar estas falhas, com grande perda de tempo e de trabalho, pela habilidade desenvolvida na manipulação de celulóide e de gesso (com várias velocidades de endurecimento) para a confecção de “parelhagem” tosca mas que possuía o grau de sensibilidade suficiente aliada ao mínimo de inércia. Com o agravamento constante da falta de verba, nos serviços públicos (apesar da admissão contínua de novos “funcionários”) temos tido necessidade freqüente de comprar com ônus pessoal drogas e pequenos materiais e elementos para rações, para não ver inutilizado um tempo de experiência mais longo”.

“Isto sem se falar na necessidade de aquisição particular de livros e de bibliofilms, sendo que êstes, depois que o serviço foi “centralizado” pela Reitoria da Universidade conseguiu reunir a perfeição de se tornar mais caro, mais demorado e mais incompleto”.

“Aliás, esta mania centralizadora parece estar na massa do sangue brasileiro: tendo resultados tão sécos no tempo do Império, parecia estar destruída pela República, para repontar depois em pleno vigor no período ditatorial, continuando-se em seguida em âmbito de amplitude menos nacional mas não menos nociva”.

TRABALHOS PUBLICADOS

- 1 — PEREIRA JR., J. & CARDOSO, D. M. — 1934 — Hypophyse et ovulation chez les poissons. *C. r. Soc. Biol. Paris* 116: 1133.
- 2 — IHERING, R., AZEVEDO, P., PEREIRA JR., J. & CARDOSO, D. M. — 1935 — Hypophysis and fish reproduction. *The Sechenow Journal of Physiology of the U. S. S. R.* XXI, 5-6 (Comunicado ao XV Congresso Internacional de Fisiologia, Moscou) 14-8-1935.
- 3 — GALVÃO, P. E. & PEREIRA JR., J. — 1936 — Über den Einfluss der Milchsäure auf die Gehirnatmung der Säugetiere bei Avitaminose B. *Bioch. Z.*, 239: 136-42 Berlin. (Comunicado ao XV Congresso Internacional de Fisiologia, Moscou) em 14-8-1935.
- 4 — GALVÃO, P. E., & PEREIRA JR., J. — 1936 — Über die Wirkung des Vitamin B-Komplexes auf die Muskelatmung beim experimentellen Beriberi. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*, 245: 19-22. Berlin und Leipzig (Comunicado ao XV Congresso Internacional de Fisiologia, Moscou) em 14-8-1935.
- 5 — GALVÃO, P. E. & PEREIRA JR., J. — 1937 — Quociente de oxidação do ácido lático (de Mayerhoff) do istmo do encephalo de aves normais e em avitaminose B₁. Comunicado ao III Congresso Sul-americano de Química. Publicado em *Atas e trabalhos*, 5: 165-6. Rio de Janeiro — São Paulo.
- 6 — GALVÃO, P. E. & PEREIRA JR., J. — 1938 — Sobre a oxidação do ácido lático no encephalo de animais normais e em avitaminose B₁. Localização de lesão química nos mamíferos e nas aves. *Arq. Instit. Biol.*, 9: 25-37.
- 7 — GALVÃO, P. E., FLORENCE, C. H. & PEREIRA JR., J. — 1938 — Modificação do método permanganico-iodométrico para a dosagem do ácido láctico. *Arq. Inst. Biol.*, 9: 39-50.
- 8 — GALVÃO, P. E., FLORENCE, C. H. & PEREIRA JR., J. — 1939 — Contribuição à fisiologia da vitamina B₁. In "Livro de homenagem aos professores Álvaro e Miguel Ozório de Almeida", 271-82. Rio de Janeiro.
- 9 — GALVÃO, P. E. & PEREIRA JR., J. — 1940 — Quociente de oxidação do ácido lático no encephalo de aves normais em avitaminose B₁. *Arq. Inst. Biol.*, 11: 139-46.
- 10 — GALVÃO, P. E., & PEREIRA JR., J. — 1942 — Estudo das condições para a completa destruição de todo o sistema nervoso central nos mamíferos. *Arq. Inst. Biol.*, 13: 1-8.
- 11 — GALVÃO, P. E., & PEREIRA JR., J. — 1942 — Evidências da destruição do sistema nervoso central pela técnica de compressão com solução hipertônica de NaCl. I — Inexcitabilidade dos centros reflexos. *Arq. Inst. Biol.*, 13: 9-11.

- 12 — GALVÃO, P. E., & PEREIRA JR., J. — 1942 — Evidências da destruição do sistema nervoso central pela técnica de compressão com solução hipertônica de NaCl. II — Inexcitabilidade dos centros nervosos ao estímulo direto. *Arq. Inst. Biol.*, 13: 13-6.
- 13 — GALVÃO, P. E., & PEREIRA JR., J. — 1942 — Evidências da destruição do sistema nervoso central pela técnica de compressão com solução hipertônica de NaCl. III — Insensibilidade a doses maciças de estriknina. *Rev. Brasil. Biol.*, 2: 173-5.
- 14 — GALVÃO, P. E., & PEREIRA JR., J. — 1942 — Evidências da destruição do sistema nervoso central pela técnica de compressão com solução hipertônica de NaCl. IV — Queda limite da pressão arterial. *Rev. Brasil. Biol.*, 2: 177-83.
- 15 — GALVÃO, P. E., & PEREIRA JR., J. — 1942 — Evidências da destruição do sistema nervoso central pela técnica de compressão com solução hipertônica de NaCl. V — Abolição da atividade dos centros cárdio-vasculares. *Rev. Brasil. Biol.*, 2: 185-92.
- 16 — GALVÃO, P. E., PEREIRA JR., J. & LIMONGI, J. P. — 1945 — Lactic acid oxidation quotient in minced brain of normal and avitaminotic chicken. *J. Biol. Chem.*, 157: 667-71.
- 17 — PEREIRA JR., J. — 1946 — After stretch potentiation of muscular contraction in mammals (Preliminary report). *Rev. Brasil. Biol.*, 6: 255-8.
- 18 — PEREIRA JR., — 1948 — Vagotomia alta bilateral na cobaia. I — Importância da irritabilidade do sistema nervoso central na duração da sobrevida. *Arq. Inst. Biol.*, 18: 339-61.
- 19 — PEREIRA, JR., J. — 1948 — Sensibilidade intensa ao Benadryl. Um caso de acidente encefalopático curado com sequela mínima e revisão da bibliografia acerca de intoxicação por êsse medicamento. *Rev. Paul. de Med.*, 33: 55-68.
- 20 — RAMOS, J., KNEESE DE MELO, H., SPORQUES, F., RATTO, O., BORGES, S. & PEREIRA JR., J. — 1949 — Provável origem dos acidentes que constituem o complexo ventricular inicial na derivação unipolar VR. *Arq. Brasil. Cardiol.* 2: 27-44.
- 21 — PEREIRA JR., J. — 1951 — Potenciação pós-tetânica da contração muscular na cobaia sob arsênito de sódio. *Arq. Inst. Biol.*, 20: 109-26.
- 22 — PEREIRA JR., J. — 1952 — Transient oxytoxic depression of immature guinea pig fed on grass. *Endocrinology*, 50: 124-33.
- 23 — PEREIRA JR., J. — 1954 — Tolerância à "Micelina" em mamíferos. *Arq. Inst. Biol.*, 21: 65-71.
- 24 — PEREIRA JR., J. — 1954 — Atividade sedativa bulbar da "Micelina" no cão. *Arq. Inst. Biol.*, 21: 73-84.

- 25 — PEREIRA JR., J. — 1956 — Método rápido de libertação da mucilagem do café despulpado pela ativação de suas próprias enzimas. I — Esterases pancreáticas e ativadores catiônicos na desgomagem do café despulpado. *Arg. Inst. Biol.*, 23: 79-86.
- 26 — PEREIRA JR., J. — 1957 — Método rápido de libertação da mucilagem do café despulpado pela ativação de suas próprias enzimas e o problema da bebida fina. *Anhembi*, 22 (82): 70-88.
- 27 — PEREIRA JR., J. — 1957 — Método rápido de libertação da mucilagem do café despulpado pela ativação de suas próprias enzimas. II — Desgomagem rápida do café despulpado em contraste com a fermentação prolongada: mucilagem bruta liberada. *Arg. Inst. Biol.*, 24: 93-103.
- 28 — PEREIRA JR., J. — 1958 — Despulpamento e produção de cafés de fino paladar. *O Sólo* (em publicação).
- 29 — PEREIRA JR., J. — 1958 — Vagotomia alta bilateral na cobaia. II — Hiperexcitabilidade do sistema nervoso central, hiperventilação e lesões ulcerosas do estômago. *Rev. Gastroenter.* (em publicação).

VIDA CIENTÍFICA DE CLEMENTE PEREIRA

POR

Waldemar Ferreira de Almeida

Do Instituto Biológico de São Paulo

Sua carreira de pesquisador Clemente Pereira iniciou-a juntamente com o curso médico. Segundo-anista da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, já publicava seu primeiro trabalho sobre a fauna helmintológica dos ofídeos brasileiros (1). Como ele sempre assinalava, Lauro Travassos, então professor catedrático de Parasitologia naquela Faculdade, e que se tornou depois seu grande amigo, teve grande influência em sua orientação inicial para a helmintologia, desenvolvendo e orientando seu pendor natural para a pesquisa científica. Ainda quando estudante publicou dezessete trabalhos sobre helmintologia (1 a 16, 61). Zeferino Vaz, colega de turma na Faculdade de Medicina e amigo de sempre, era então seu companheiro inseparável de lutas e de trabalhos científicos.

Começou a trabalhar no Instituto Biológico em 1929, adestrando-se no campo da zoologia com Rodolpho von Ihering e também se beneficiando da influência de H. da Rocha Lima. Com André Dreyfus teve despertado seu interesse por problemas de ordem mais geral sobre biologia.

Até 1935 Clemente dedicou-se exclusivamente à helmintologia, esclarecendo peculiaridades morfológicas, etológicas e sistemáticas de parasitos, expondo resultados obtidos com técnicas originais, e também publicando trabalhos de alcance mais geral dentro da parasitologia. Dessa época em diante, assumindo a chefia da Seção de Zoologia do Instituto Biológico, posteriormente denominada Parasitologia, começou a diversificar suas atividades científicas, sem abandonar sua especialidade. Iniciou publicações sobre acarologia e protozoologia. Começou também a formar escola, iniciando, tanto jovens estudantes, como também pessoas já formadas que, sob sua orientação, foram se especializando nos diferentes setores da parasitologia.

Em seu laboratório sempre havia estagiários, familiarizando-se com a pesquisa e com as técnicas parasitológicas. Clemente sempre estava ao lado de seus assistentes e estagiários. Conhecia de perto o trabalho de cada um porque junto também trabalhava. Auxiliava a todos e colaborava na resolução das dificuldades surgidas. Sua alegria sincera em cada pequena vitória conseguida por um de seus colaboradores era motivo de estímulo para os que tiveram o prazer de trabalhar com ele.

O renome científico de Clemente desde logo cruzou oceanos. Com 29 anos de idade sua fotografia já estava no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Osaka, Japão, figurando na Galeria dos Eminentes Parasitologistas.

Trabalhou no Instituto Biológico cêrca de 28 anos, sempre com o mesmo entusiasmo e dedicação.

Seus trabalhos publicados ultrapassam a casa da centena. Destacaremos aqui alguns dêles, procurando mostrar as diferentes facetas de seu espírito de pesquisador meticoloso e incansável e de sua inteligência invulgar, mantida permanentemente alerta por leitura atualizada, sempre encontrando rumos novos, mesmo em velhos problemas.

A PROPÓSITO DA SISTEMÁTICA

Muitos dos trabalhos de Clemente versaram sôbre morfologia de parasitos, especialmente de helmintos, mas também de protozoários e de artrópodos. Não era, porém, um morfologista exclusivo, pois preocupava-se com os aspectos dinâmicos dos problemas abordados. Ahamos oportuno destacar um trecho do trabalho sôbre a análise dos caracteres taxinômicos de um pseudo-escorpião, onde é focalizada a questão do chamado “espécime-tipo”.

“A análise da variação desta espécie (*Pycnocheres eidmanni* BEIER, 1935) veio focalizar mais uma vez o problema do “espécime-tipo” das espécies, em sistemática. Êste conceito, suficiente para a época das diagnoses curtas das espécies das faunas e floras locais, decorria da crença numa rigidez dos caracteres específicos, o que não só a experiência atual não tem conseguido confirmar, como está sendo interpretado em termos precisos pelo estudo das populações”. “Assim sendo, pensamos que seria tempo de evitarem os naturalistas, sempre que possível, o exame sumário de raros exemplares de uma espécie na ânsia de apôr-lhes a etiqueta **sp. n.**, para substituí-lo pelo estudo minucioso, demorado, lento e nem sempre bem compreendido pelos leigos, da sua organização, bionomia e ecologia, baseado não só em técnicas adequadas, como num amplo espírito científico, a fim de que possa resultar da grande massa dos trabalhos que se publicam um progresso real no conhecimento dos seres vivos, tornando desnecessário o recorrer-se per-

manentemente ao re-estudo do que já havia sido estudado, cada vez que o nível de exigência em matéria de conhecimento se torna mais elevado" (80).

HELMINTOLOGIA

A helmintologia foi o assunto de sua predileção. Provam-no os 57 trabalhos publicados sobre o assunto (1 a 45, 61, 63, 64, 73, 84 a 90, 96). No início trabalhou principalmente em sistemática, de modo exaustivo. Nesse período, Z. Vaz foi colaborador em diversos de seus trabalhos.

Sua tese de doutoramento (16), além de versar sobre um helminto dos mais especiais, registra o primeiro caso de transmissão de um verme por contágio venéreo, através dos espermatóforos das sanguessugas hospedeiras. Este trabalho, feito ainda no início da carreira, mostra a vocação de Clemente para a pesquisa, pois, segundo a opinião de L. Travassos, pode ser colocado entre suas melhores publicações.

Quando no Serviço de Piscicultura do Nordeste, esclareceu a taxinomia de uma nova espécie de helminto parasito de peixe, e a sua bionomia. Este trabalho foi feito em colaboração entre dois centros de pesquisas, situados a milhares de quilômetros de distância, um em São Paulo e outro no Ceará (32). Os helmintos de peixes do Nordeste foram ainda objetos de vários outros trabalhos (30, 31, 36). Fêz também observações sobre as condições helmintológicas do Nordeste (19) e sobre a questão dos helmintos na pecuária de Pernambuco (20).

Estudou a morfologia, bionomia e ecologia dos até então enigmáticos temnocéfalos, que vivem como inquilinos em vários animais de água doce (38, 41).

Evidenciou outro fato de importância biológica, que consiste em um parasito induzir o hospedeiro à formação de um órgão especial para se alojar, órgão este que não tem o caráter de uma simples reação inflamatória. "Este é um exemplo excelente de profunda adaptação morfológica entre o hospedeiro e seu parasito, conduzindo a um "modus vivendi" inteiramente excepcional no que diz respeito ao parasitismo nos animais" (42).

Esclareceu vários problemas relativos à "esponja" ou "ferida de verão" dos equídeos. Analisou o comportamento das larvas do helminto na mosca doméstica, o determinismo da sua saída para infestar o cavalo, e o papel da predisposição dos equídeos no tipo de reação inflamatória, que resulta em um granuloma. Dois pontos de

vista antagônicos existentes na literatura sobre o assunto foram conciliados: a explicação pelo parasitismo do *Habronema* e a explicação em bases hereditárias (43 a 45).

PROTOZOOLOGIA

Os protozoários intestinais foram objeto de vários anos de estudo, principalmente os flagelados do gênero *Trichomonas*. O exame exaustivo e minucioso de suas culturas permitiu esclarecer a verdadeira significação das formas amebóides e dos pseudo-cistos (46), além de esclarecer vários outros problemas controvertidos como pedúnculos, autotomia, citóstoma, estrutura do axostilo e grânulos cromáticos (50).

Uma viagem efetuada à zona do pantanal de Mato Grosso permitiu-lhe estudar o "mal de cadeiras" que atinge os cavalos dessa região. O problema foi focalizado do ponto de vista ecológico, salientando sua verdadeira significação:

"Considerando que a cavallhada do pantanal possui alimentação deficiente e que os trabalhos de pastoreio têm de ser exercidos em espaço muito amplo, parece ser esta uma causa suficiente para que os cavalos da região não exibam um estado físico muito brilhante. Naturalmente, nessas condições de sub-alimentação, o excesso de trabalho, a ação combinada dos tripanosomas, gastrófilos e de um grande número de insetos hematófagos, faz com que os cavalos permaneçam em um estado de permanente deficiência nutritiva, principalmente anemia, de tal modo que, quando as más condições de vida se agravam, logo depois das cheias, não estão eles em condições de resistir a mais essa sobrecarga, vindo a morrer, com a apresentação daquele complexo de sinais que recebe vulgarmente a denominação de mal-de-cadeiras. Temos a impressão de que a tripanosomose equina é um dos componentes do complexo de condições determinantes do mal-de-cadeiras no pantanal de Mato Grosso, mas não encontramos elementos claros que nos autorizassem a crer que seu papel na etiologia dessa síndrome seja particularmente saliente" (47).

Estava iniciando estudos sobre a influência da temperatura cutânea no desenvolvimento das lesões leishmanióticas da covaia (52) quando foi hospitalizado; mesmo no leito, continuou a acompanhar os trabalhos pelos relatórios de seus colaboradores.

ACAROLOGIA

Durante cerca de quatro anos foram feitas investigações sobre um pequeno ácaro que vive em relação com a mosca doméstica (54) e que encerrava um punhado de problemas, desde os de taxinomia e de técnica, até os de suas relações com a mosca. Ao contrário do que se pensava, o ácaro não parasita a mosca adulta, limitando-se a ser forético sobre ela; entretanto suas ninfas predam ativamente os ovos e larvas novas da mosca nas esterqueiras, para onde são conduzidas pelas próprias moscas.

Além disso, o ácaro é notável por apresentar partenogênese arrenótoca, do tipo himenóptero, que se entrosa admiravelmente com seus hábitos foréticos e a vida nas esterqueiras (57).

Estudando a proteroninfa do carrapato do boi, foi verificado ser esta altamente excepcional em seus hábitos alimentares, fugindo à definição do grupo, por não ser hematófaga. Sua alimentação é do tipo da dos trombídeos, isto é, com restos necróticos da reação inflamatória provocada no hospedeiro (56).

RATADAS NO SUL DO BRASIL

Periódicamente as regiões agrícolas do sul do Brasil são perturbadas pelas devastações produzidas por certos ratos silvestres, os chamados “ratos de praga”, cujas invasões constituem o que localmente recebe a denominação de “ratadas” ou “praga de ratos”. Este assunto, além do interesse científico, tem importância médica e econômica nas regiões em que ocorre. Sua periodicidade está ligada ao florescimento de certas espécies de taquaras.

Em 1940 ocorreu uma dessas ratadas no Paraná. Foi Clemente estudar o fenômeno “in loco”. Verificou ser a frutificação da taquaralixa (*Merostachys fistulosa* DOELL.) a responsável pelo início do fenômeno. Os ratos (*Oryzomys longicaudatus* BENNET e *Rattus rattus* L.) dirigem-se para os taquarais frutificados; têm grande predileção por essas sementes (“arroz de taquara”) que caem ao chão; multiplicam-se intensamente. Esgotando-se o estoque de “arroz de taquara” há série crise alimentar, provindo deste fato a invasão das plantações, paiois e residências.

O assunto era apaixonante. Voltando do Paraná, Clemente mergulhou nas bibliotecas para estudar tudo o que já houvesse sido publicado sobre ratadas e frutificações de taquaras. Verificou que o ciclo vegetativo da “taquara lisá” (*Merostachys* sp.) é de cerca de 11 anos, coincidindo com o ciclo das manchas solares. Entretanto, a “taquara-lixá”, responsável pelo desencadeamento do fenômeno, tem um

ciclo vegetativo de cerca de 33 anos (triplo do das manchas solares), coincidindo também com o ciclo das ratadas.

Examinando um gráfico das manchas solares, Clemente verificou que as florações da “taquara-lixá” ocorrem cerca de 2 a 3 anos antes do mínimo de cada terceiro ciclo dessas manchas.

Clemente, na exaustiva pesquisa bibliográfica que fez, encontrou trabalhos referindo haver vários ciclos biológicos coincidentes com os ciclos de manchas solares, e outros que são triplos destes, como o ciclo de certos insetos das florestas da Alemanha, o número de várias aves e o nível de água do lago Alberta.

Tudo o que pôde observar ou lêr sobre as taquaras e sobre praga de ratos está assinalado em seu trabalho; não se esqueceu até de anotar as crendices populares sobre o assunto. Termina dizendo:

“Esperamos que, com o conhecimento de novos dados, seja possível esclarecer em definitivo as relações causais entre o ciclo das manchas solares e o ciclo vegetativo das taquaras brasileiras, para cujo esclarecimento o presente trabalho representa apenas uma primeira aproximação” (79).

INOVAÇÕES E APERFEIÇOAMENTOS DE TÉCNICA

Clemente sabia resolver com elegância suas dificuldades no laboratório. Observador ao extremo, quando surgia um problema novo de ordem técnica, sempre se lembrava de aplicar algo visto antes, em circunstâncias diferentes, mas que talvez desse certo para o caso presente.

Lembramos, por exemplo, a nota sobre o aparelho de Baerman (61). Idealizou também, com uma caixa de Petri, um aparelho prático para a cultura e isolamento de larvas de nematóides monoxenos de penetração ativa (64), e um dispositivo simples e eficiente para o xenodiagnóstico da moléstia de Chagas (65). Junto com L. Travassos Filho, imaginou o emprêgo de “tatuzinhos” para a limpeza de crânios de pequenos vertebrados (62) e também a utilização de recipientes de barro poroso para criação de artrópodos, mantendo umidade relativa elevada no interior dos recipientes (70).

Outras vezes, não contente com os processos técnicos usuais, dispunha-se a procurar um modo novo que permitisse melhor conservação ou melhor coloração para seus materiais. Assim, para a toto-montagem de nematóides imaginou um processo simples e rápido, ficando o material sem encarquilhar e geralmente com nitidez

e beleza surpreendentes (63). Baseado nas afinidades tintoriais acidófilas da quitina dos artrópodos, experimentou, com sucesso, um método para diafanizá-los, utilizando uma solução levemente alcalina de carbonato de sódio. Este processo conserva perfeitamente os tecidos moles e permite o estudo adequado da musculatura e dos diversos aparelhos em toto-montagens (66). Estudou, junto com M. P. de Castro, um método de impregnação argêntica para estudo da morfologia interna de invertebrados microscópicos. Os vários órgãos internos tomam diferentes tons de castanho, permitindo reconhecer facilmente sua morfologia integral e os acidentes quitinosos mais delicados são realçados (67).

DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA

Cerca de vinte trabalhos de divulgação foram publicados por Clemente. Os cinco primeiros, em colaboração com Z. Vaz, versaram sobre helmintíases dos animais domésticos (84 a 88). Seguiram-se onze outros trabalhos sobre assuntos diversos.

Entretanto, merecem destaque especial os trabalhos de Clemente que situaram em seu verdadeiro terreno as idéias de Lissienko sobre hereditariedade, tendentes a salientar certas supostas virtudes do "mitchurinismo".

"A história começa quando o Prof. H. da Rocha Lima, então Diretor do Instituto Biológico, pediu-me, em fins de 1949, que estudasse o que havia de real sobre o rumoroso caso Lissienko, na U. R. S. S., para eventual palestra numa das habituais reuniões do Instituto".

"Procurei consultar toda a bibliografia sobre o assunto, no que contei com a inestimável assistência do Prof. André Dreyfus.

Entretanto, quando tive em mãos as Atas da Academia Lenin de Ciências Agrícolas, edição em Inglês, de 1949, impressas em Moscou, pareceu-me que nada melhor podia fazer senão extrair diretamente desse farto e insuspeito manancial todo o material necessário para elaborar a discussão do tema" (102).

"Aliás, a característica da nova "escola" soviética é justamente a inexistência de um critério experimental seguro, a ausência de controle nos experimentos, o que confere a esse gênero de trabalho, há muito superado em ciência, o feitiço de mera casuística finalista, destinada

a proporcionar resultados a gosto do interessado. Por essa maneira de trabalhar os resultados tornam-se convincentes apenas para os “crentes” que, isentos do fantasma da dúvida, consideram a experimentação simples ritual “materialista”. É confortador, entretanto, assinalar que, para o próprio Lissienko, a nossa ciência e a sua “doutrina” encontram-se separadas por um abismo intransponível”.

“Todo o trabalho de Lissienko e de sua gente é imensamente facilitado pela eliminação de vários outros “formalismos”, a saber: corantes, vírus, vitaminas, hormônios, análise estatística dos resultados numéricos experimentais, etc.; para eles, o “olhômetro” seria mais do que suficiente, e as aplicações da estatística em biologia um mero “abiologismo” (102).

Os trabalhos de Clemente sobre a nova “ciência” russa (100 a 103) e as discussões públicas em que debateu o assunto no Instituto Biológico e na Associação Paulista de Medicina bastante contribuíram para sustar entre nós a onda de falsidade bem organizada que procurava confundir ciência com propaganda de certo regime político, associada à pusilanimidade de vários espíritos comodistas.

ATIVIDADES DIDÁTICAS

Quando cursava o segundo ano de medicina, Clemente já era monitor, auxiliando o ensino prático de Parasitologia, que então fazia parte das matérias do primeiro ano do curso médico. Ensinou parasitologia também nos cursos organizados pelo Instituto Biológico. Encarregou-se do curso de genética na Faculdade de Higiene e Saúde Pública, em 1951 e 1952, e das aulas sobre Biologia das Populações no Curso de Especialização do Instituto Butantã, em 1952.

Clemente tinha, entretanto, especial interesse pela biologia geral, revelando-se um dos mais categorizados professores desta matéria, que lecionou no Colégio Universitário da Universidade de São Paulo (1936-1937), no Colégio Pan-Americano da Escola Paulista de Medicina (1938-1942) e no Colégio Bandeirantes (1943-1958).

Suas aulas, em 1937, no Colégio Universitário anexo à Faculdade de Medicina, foram taquigrafadas e mimeografadas. No ano seguinte, após revisão pelo autor, foram reunidas em uma “Apostila de Biologia Geral” (77) que ficou célebre pelo inestimável auxílio prestado aos que se iniciavam nessa matéria.

A propósito das atividades didáticas não podemos deixar de citar as palavras de Clemente:

“Depois que experimentei ensinar, não pude mais deixar de fazê-lo. Reputo atividade importante para o pesquisador, pelo menos por dois motivos. Primeiro, pela oportunidade que proporciona de comunicar aos jovens algo de sua experiência, mais como atitude mental em face da ciência e da posição desta ante os problemas humanos do que pretexto para atulhar de pormenores esmagadores mentes desprevenidas, gerando prevenção contra o verdadeiro espírito da ciência. Em segundo lugar, êsse contacto com jovens possibilita ao pesquisador permanente atualização de seu espírito, mantendo-o ao corrente dos problemas e aspirações das novas gerações e integrando-o na mutável ambiência do seu recém-desperto país. Isso contribui para evitar a mumificação social do pesquisador, chamando-o continuamente à presença de um dos mais belos feitos daquilo que se convencionou chamar de realidade nacional” (*Folha da Manhã* de 11/1/1953, pág. 9; *Anhembi*, vol. 34, n.º 100).

OUTRAS ATIVIDADES

Clemente ainda encontrava tempo para trabalhar no Laboratório ISA, onde teve oportunidade de estudar corantes e meios refringentes para microscopia, utilizando-se principalmente de matérias primas nacionais, o que permitiu podermos contar em êles durante os anos de guerra. Colaborou eficazmente na parte científica da produção industrial de penicilina, sendo digno de nota que o Brasil foi o primeiro país latino-americano a produzir êste antibiótico, em fábrica exclusivamente nacional.

Como Redator-Chefe da Revista da Associação Médica Brasileira executou tarefa meticulosa e estafante, trabalhando desde o primeiro número desta revista e muito contribuiu para a alta conceituação que ela hoje desfruta.

Pertencia também Clemente ao Conselho Florestal do Estado, ao Conselho dos Institutos Científicos do Estado e à União Brasileira dos Escritores, prestando sempre sua colaboração inestimável.

Em 1956 foi nomeado para o cargo de Diretor do Departamento de Zoologia, sendo mais precisamente eleito sem ser candidato, pois seu nome foi escolhido pelo corpo técnico dêsse Departamento. Entre

outras realizações nesse novo cargo, obteve a ampliação das verbas destinadas ao Departamento de Zoologia e também conseguiu que seu quadro de pesquisadores fôsse aumentado a partir de 1959. A moléstia e a morte prematura impediram-no de levar avante os planos aí iniciados (82).

TRABALHOS PUBLICADOS

HELMINTOLOGIA

- 1 — PEREIRA, C. — 1927 — Fauna helmintológica dos ofídeos brasileiros. *Bol. Biol.*, São Paulo, **10**: 179-85.
- 2 — PEREIRA, C. — 1928 — *Idem* (II). *Ibidem*, **11**: 13-22.
- 3 — PEREIRA, C. — 1928 — *Idem* (III). *Ibidem*, **12**: 50-4.
- 4 — PEREIRA, C. — 1928 — Notas helmintológicas (I). *Ibidem*, **13**: 95.
- 5 — TRAVASSOS, L., ARTIGAS, P. & PEREIRA, C. — 1928 — Fauna helmintológica dos peixes de água doce do Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, **1**: 5-68.
- 6 — PEREIRA, C. — 1929 — Revisão do gênero *Opisthogonimus* (Trematoda). *Rev. Museu Paulista*, São Paulo, **16**: 993-1009.
- 7 — PEREIRA, C. — 1929 — *Travtrema travtrema*, n. gen. e n. sp., trematóide parasito do intestino de cobra. *Bol. Biol.*, São Paulo, **16**: 92-6.
- 8 — VAZ, Z. & PEREIRA, C. — 1929 — *Arduenninae* de *Bradypus tridactylus*. *Ibidem*, **15**: 1-15.
- 9 — PEREIRA, C. — 1929 — *Strongyloides ophidae*, n. sp., *Ibidem*, **15**: 16-7.
- 10 — PEREIRA, C. — 1930 — L'action oligodynamique de l'argent en biologie helminthologique. *C. R. Soc. Biol.*, Paris, **103**: 694-5.
- 11 — PEREIRA, C. & VAZ, Z. — 1930 — Nota sobre as variações dos raios da bolsa caudal de alguns *Strongyloidea*. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, **3**: 59-68.
- 12 — PEREIRA, C. & VAZ, Z. — 1930 — Origem helmíntica de uma epizootia de cabras. *Rev. Biol. e Hig.*, São Paulo, **2**: 137-41.
- 13 — VAZ, Z. & PEREIRA, C. — 1930 — Nouvel hémiuride parasite de *Sardinella aurita* (Cuv. et Vall.) *Parahemiurus* n. gen., *C. R. Soc. Biol.*, Paris, **103**: 1315-17.
- 14 — PEREIRA, C. & VAZ, Z. — 1930 — Sur un nouvel hémiuride de poisson marin. *Ibidem*, **104**: 705-6.
- 15 — PEREIRA, C. — 1931 — *Travtrema travtrema*, n. gen. e n. sp., trematóide parasito do intestino de cobra. *An. IV Conf. Sul-Amer. Hig. Microbiol. e Patol.*, Rio de Janeiro, **1**: 239-41.

- 16 — PEREIRA, C. — 1931 — *Myenchus botelhoi* n. sp., curioso nematóide parasito de *Limnobedella brasiliensis* Pinto (Hirudínea). Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 29 págs.
- 17 — IHERING, R. VON & PEREIRA, C. — 1932 — Uma grande epizootia dos peixes da bacia do rio Paranapanema. *Bol. Biol.*, Rio de Janeiro, 20: 1-35.
- 18 — PEREIRA, C. — 1933 — Novo nematóide parasito de psitacídeos. *Rev. Med. Cirúrg. do Brasil*, Rio de Janeiro, 1: 3-6.
- 19 — PEREIRA, C. — 1933 — Observações sobre as condições helmintológicas do Nordeste. *Bol. Biol. (Nova Série)*, São Paulo, 1: 33-54.
- 20 — PEREIRA, C. — 1933 — A questão dos helmintos na pecuária de Pernambuco. *Bol. Secr. Agric. Ind. e Viação*, Recife, 2: 274-83.
- 21 — PEREIRA, C. & VAZ, Z. — 1933 — Nota sobre a presença de *Paraspidodera uncinata* em cobaias de São Paulo. *Rev. Biol. Hig.*, São Paulo, 4: 52-5.
- 22 — PEREIRA, C. & VAZ, Z. — 1933 — *Carinema carinii*, n. gen. e n. sp. de filarídeo parasito de corruplão (*Xanthonus* sp.), pássaro fringiliforme. *Ibidem*, 4: 56-8.
- 23 — PEREIRA, C. & VAZ, Z. — 1933 — Nematóides parasitos de *Cynolebias bellotti* (Pisces: Cyprinodonta). *Ibidem*, 4: 59-61.
- 24 — VAZ, Z. & PEREIRA, C. — 1934 — Two new parasitic worms of *Didelphys aurita*: *Skrjabinothylax pricei* n. sp. and *Gongylonema marsupialis* n. sp.. *J. Washington Ac. Sci.*, Washington, 24: 54-6.
- 25 — VAZ, Z. & PEREIRA, C. — 1934 — On a new oxyurid-worm parasite of *Mus rattus*. *Folia Clinica et Biológica*, São Paulo, 4: 16-8.
- 26 — VAZ, Z. & PEREIRA, C. — 1934 — Contribuição ao conhecimento dos nematóides de peixes fluviais do Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 5: 87-103.
- 27 — PEREIRA, C. & VAZ, Z. — 1934 — Helmintos parasitos de aves domésticas em São Paulo, in Reis, J., Nóbrega, P. & Reis, A. S.: Moléstias de aves observadas em São Paulo. *Ibidem*, 5: 45-6.
- 28 — PEREIRA, C. — 1935 — Sobre um *Lepidonemidae* Trav., 1919 e um *Rhabdiasidae* Railliet, 1915 (Nematoda) novos. *Rev. Biol. Hig.*, São Paulo, 6: 19-21.
- 29 — PEREIRA, C. — 1935 — Os *Oxyurata* parasitos de *Lacertilia* do Nordeste Brasileiro. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 6: 5-27.
- 30 — PEREIRA, C. — 1935 — *Ascaridata* e *Spirurata* parasitos de peixes do Nordeste Brasileiro. *Ibidem*, 6: 53-62.
- 31 — VAZ, Z. & PEREIRA, C. — 1935 — Some new Brazilian nematodes. *Trans. Amer. Microsc. Soc.*, Menasha, 54: 36-40.

- 32 — PEREIRA, C., VIANNA DIAS, M. & AZEVEDO, P. DE — 1936 — Biologia do nematóide *Procamallanus cearensis* n. sp., *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 7: 209-26.
- 33 — PEREIRA, C. — 1936 — Nota sobre a acanthella de *Oncicola oncicola* (Von Ihering, 1892). *Ibidem*, 7: 245-52.
- 34 — PEREIRA, C. — 1937 — *Rhabditis hambletoni* n. sp., nema aparentemente semiparasito da "broca do algodoeiro" (*Gasterocercodes brasiliensis*). *Ibidem*, 8: 215-30.
- 35 — PEREIRA, C. — 1937 — On *Thelandros scleratus* Trav., 1923. *Papers on Helminthology, published by The All-Union Lenin Academy of Agricultural Sciences*, Moscou: 436-66.
- 36 — PEREIRA, C. — 1938 — *Travnema travnema* n. g. e n. sp. (Nematoda: *Oxyuridae*), parasito de *Curimatus elegans* (Pisces: *Characiniidae*) do Nordeste Brasileiro. *Livro Jubilar do Prof. L. Travassos*, Rio de Janeiro: 381-84.
- 37 — PEREIRA, C. & CUOCOLO R. — 1939 — A propósito de *Postharmostomum commutatum* (Diesing, 1858). *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 10: 73-86.
- 38 — PEREIRA, C. & CUOCOLO, R. — 1940 — Contribuição para o conhecimento de morfologia, bionomia e ecologia de *Temnocephala brevicornis* Monticelli, 1889. *Ibidem*, 11: 367-98.
- 39 — PEREIRA, C. & CUOCOLO, R. — 1940 — Trematóides brasileiros do gênero *Mesocoelium* Odhner, *Ibidem*, 11: 399-412.
- 40 — PEREIRA, C. & CUOCOLO, R. — 1940 — Trematóides vesicais de anfíbios do Nordeste Brasileiro. *Ibidem*, 11: 413-20.
- 41 — PEREIRA, C. & CUOCOLO, R. — 1941 — Estudos sobre *Temnocephalidae* Monticelli, 1889, com estabelecimento de dois novos gêneros australianos e descrição de duas novas espécies neotrópicas. *Ibidem*, 12: 101-27.
- 42 — PEREIRA, C. & CUOCOLO, R. — 1941 — Processo papilomatoso das vias biliares de *Leptodactylus ocellatus* (L.) determinado por *Choledocystus eucharis*, n. gen., n. sp. (Trematoda: *Plagiorchiidae*). *Ibidem*, 12: 311-24.
- 43 — MELLO, M. J. DE & PEREIRA, C. — 1946 — Determinismo da evasão das larvas de *Habronema* sp. da tromba da mosca doméstica. *Ibidem*, 17: 259-66.
- 44 — PEREIRA, C. & MELLO, M. J. DE — 1948 — Papel da predisposição do hospedeiro na produção da habronemose cutânea ("esponja") dos eqüídeos. *Ibidem*, 18: 363-80.
- 45 — PEREIRA, C., MELLO, M. J. DE & CASTRO, M. P. DE — 1949 — Reação tissular às larvas de *Habronema muscae* (Carter) no decorrer de uma esponja experimental em cavalo. *Ibidem*, 19: 275-82.

PROTOZOOLOGIA

- 46 — PEREIRA, C. & ALMEIDA, W. F. DE — 1940 — Sobre a verdadeira natureza das “formas ameboides”, dos pretensos “cistos” e “formas de-generativas” no gênero *Trichomonas* Donné, 1836. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 11: 347-66.
- 47 — PEREIRA, C. & ALMEIDA, W. F. DE — 1941 — Observações sobre para-sitologia humana e veterinária em Mato Grosso in Relatório da quinta excursão do Instituto Oswaldo Cruz, realizada à zona da Estrada de Ferro Noroeste do Brasil, em janeiro de 1941. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 36: 301-9.
- 48 — PEREIRA, C. & ALMEIDA, W. F. DE — 1941 — Protozoários intestinais de vertebrados observados em Salobra, in *idem*, *ibidem*, 36: 321-24.
- 49 — PEREIRA, C. & ALMEIDA, W. F. DE — 1942 — *Amylophorus rochalimai*, n. g., n. sp., (*Ciliata: Bütchliidae*) do intestino grosso de *Dasyprocta azarae* Lichtenstein, 1823 (*Rodentia: Caviidae*). *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 13: 261-70.
- 50 — PEREIRA, C. & ALMEIDA, W. F. DE — 1943 — Sobre alguns preconceitos morfológicos no gênero *Trichomonas* Donné, 1836 e sua signi-ficação taxonômica. *Ibidem*, 14: 195-206.
- 51 — PEREIRA, C. & ALMEIDA, W. F. DE — 1943 — Revisão das espécies de *Trichomonas* Donné, 1836 da galinha e do pombo doméstico. *Ibidem*, 14: 273-96.
- 52 — PEREIRA, C., CASTRO, M. P. DE & MELLO, D. DE — 1958 — Influência da temperatura cutânea no desenvolvimento de lesões leishma-nióticas. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 25: 41-58.

ACAROLOGIA

- 53 — PEREIRA, C. — 1937 — Dados ecológicos sobre ovos e ninfas hexápodos de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1888). *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 8: 135-44.
- 54 — PEREIRA, C. & CASTRO, M. P. DE — 1945 — Contribuição para o conhe-cimento da espécie-tipo de *Macrocheles* Latr. (*Acarina*): *M. muscaedomesticae* (Scopoli, 1772) *emend.* *Ibidem*, 16: 153-86.
- 55 — PEREIRA, C. & CASTRO, M. P. DE — 1945 — Sobre um ginandromorfo de *Rhipicephalus sanguineus* Latr., 1804. *Ibidem*, 16: 187-92.
- 56 — CASTRO, M. P. DE & PEREIRA, C. — 1946 — Alimentação das protero-ninfas de *Boophilus (Uroboophilus) microplus* Can., 1888 (*Ixo-didae*) com os restos necróticos da reação tissular do hospedeiro. *Ibidem*, 17: 149-62.
- 57 — PEREIRA, C. & CASTRO, M. P. DE — 1947 — Forese e partenogênese arrenótoca em *Macrocheles muscaedomesticae* (Scopoli) (*Aca-rina: Macrochelidae*) e sua significação ecológica. *Ibidem*, 18: 71-89.

- 58 — CASTRO, M. P. DE & PEREIRA, C. — 1947 — Ácaros nasícolas (*Parasitiformes: Rhynonyssidae*) do pardal- *Passer domesticus* L., *Ibidem*, 18: 125-33.
- 59 — PEREIRA, C. & CASTRO, M. P. DE — 1949 — Revisão da subfamília *Ptilonyssinae* Castro, 1948 (*Acari Mesostigmata: Rhynonyssidae* Vitz.) com a descrição de algumas espécies novas. *Ibidem*, 19: 217-35.
- 60 — CASTRO, M. P. DE & PEREIRA, C. — 1951 — *Rhinoptes gallinae* n. g., n. sp. (*Acari — Sarcoptiformes: Epidermoptidae*), das fossas nasais da galinha, e crítica do conceito de cohortes nos *Acariidae* Latr. *Ibidem*, 20: 67-72.

INOVAÇÕES E APERFEIÇOAMENTOS DE TÉCNICA

- 61 — PEREIRA, C. — 1930 — Nota sobre o aparelho de Baerman. *Rev. Med.*, São Paulo, 14: 70-2.
- 62 — PEREIRA, C. & TRAVASSOS, F.^o, L. — 1934 — O emprêgo dos tatuzinhos *Oniscidae* (*Crustacea, Isopoda*) na preparação de crânios de vertebrados. *Rev. Biol. e Hig.*, São Paulo, 5: 67-8.
- 63 — PEREIRA, C. & VAZ, Z. — 1934 — Toto-montagem de nematóides: nova e simples técnica para a montagem em bálsamo. *Arg. Inst. Biol.*, São Paulo, 5: 77-86.
- 64 — PEREIRA, C. — 1935 — Método prático para a cultura e isolamento das larvas de nematóides monoxenos de penetração ativa. *Bol. Biol.* (Nova Série), São Paulo, 2: 82-3.
- 65 — PEREIRA, C. — 1939 — Upon the detection of *Schizotrypanum cruzi* (Chagas 1909) infections in reduviid bugs. Volumen Jubilare Pro Prof. Sadao Yoshida, Osaka, 2: 363-6.
- 66 — PEREIRA, C. — 1940 — Sobre a diafanização dos artrópodos. *Rev. Entomol.*, Rio de Janeiro, 11: 642-4.
- 67 — PEREIRA, C. & CASTRO, M. P. DE — 1943 — Um método de impregnação argêntica para o estudo da morfologia interna de invertebrados microscópicos. *Arg. Int. Biol.*, São Paulo, 14: 207-12.
- 68 — PEREIRA, C. & MEDINA, H. — 1945 — Viragem da coloração por uma laca férrea de hemateína pela prata amoniaca, para o estudo das leishmânias, principalmente nos tecidos. *Ibidem*, 16: 41-8.
- 69 — PEREIRA, C. & CASTRO, M. P. DE — 1946 — Cultura de ácaros e de alguns outros aracnídeos predadores. *Livro de Homenagem a R. F. d'Almeida*, São Paulo: 285-8.
- 70 — TRAVASSOS F.^o, L. & PEREIRA, C. — 1947 — Comportamento da umidade em recipientes de barro poroso para a criação de artrópodos. *Papéis Avulsos do Depto. Zool.*, São Paulo, 8: 123-6.

DIVERSOS

- 71 — PEREIRA, C. — 1934 — Protozoários *in* Ihering, R. von: *Da Vida dos Nossos Animais — Fauna do Brasil*, Roterundo & Cia., São Leopoldo: 283-90.
- 72 — PEREIRA, C. — 1934 — Celenterados. *Ibidem*: 275-82.
- 73 — PEREIRA, C. — 1934 — Vermes. *Ibidem*: 259-74.
- 74 — PEREIRA, C. & TRAVASSOS F.^o, L. — 1935 — Sobre a ação anti-culicídica das planárias. *Rev. Biol. e Hig.*, São Paulo, 6: 22-30.
- 75 — PEREIRA, C. — 1935 — Castelnau e o Brasil. *Bol. Biol. (Nova Série)*, São Paulo, 2: 84-95.
- 76 — PEREIRA, C. — 1935 — A vida científica do Prof. Ernst Breslau, *Ibidem*, 2: 113-5.
- 77 — PEREIRA, C. — 1938 — Biologia Geral. *Edição Mimeografada* de M. Adura & W. F. de Almeida, São Paulo, 398 páginas.
- 78 — PEREIRA, C. — 1940 — Rodolpho von Ihering (1883-1939). *Arq. Zool. do Est. S. Paulo*, São Paulo, 1: 491-502.
- 79 — PEREIRA, C. — 1941 — Sobre as ratadas no sul do Brasil e o ciclo vegetativo das taquaras. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 12: 175-96.
- 80 — PEREIRA, C. & CASTRO, M. P. DE — 1944 — Morfologia externa e análise dos caracteres taxonômicos de *Pycnocheres eidmanni* Beier, 1935 (*Chelonethida: Chernetidae*), das panelas de lixo de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908. *Ibidem*, 15: 239-61.
- 81 — PEREIRA, C. & CASTRO, M. P. DE — 1946 — Sobre o equilíbrio genético estável. *Ibidem*, 17: 267-8.
- 82 — PEREIRA, C. — 1957 — Relatório das atividades do Departamento de Zoologia em 1956. *Arq. Zool. do Est. S. Paulo*, São Paulo, 10: 5-9.
- 83 — PEREIRA, C. — 1958 — Traços biográficos de João Pereira Júnior. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 25: 1-12.

DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA

- 84 — PEREIRA, C. & VAZ, Z. — 1932 — Helmintoses do porco doméstico. *Divulg. Cient. da Div. Animal do Inst. Biol.*, São Paulo, 8 páginas.
- 85 — PEREIRA, C. & VAZ, Z. — 1932 — Helmintoses dos ruminantes (boi, cabra, carneiro). *Ibidem*, 7 páginas.
- 86 — PEREIRA, C. & VAZ, Z. — 1932 — Helmintoses dos eqüídeos (cavalo e burro). *Ibidem*, 4 páginas.
- 87 — PEREIRA, C. & VAZ, Z. — 1932 — Helmintoses dos carnívoros domésticos (cão e gato). *Ibidem*, 6 páginas.

- 88 — PEREIRA, C. & VAZ, Z. — 1933 — Como combater as verminoses do porco. *Chácaras e Quintais*, São Paulo, 47: 349-51.
- 89 — PEREIRA, C. — 1933 — Em defesa da pecuária do Estado. *Diário da Manhã*, Recife, ano IV, n.º 1871, 1.º de julho.
- 90 — PEREIRA, C. — 1934 — A helmintologia no curso de criadores do Instituto Biológico. *Diário da Noite*, São Paulo, ano X, n.º 2793, 26 de janeiro.
- 91 — PEREIRA, C. — 1934 — O alho sem elogios. *Chácaras e Quintais*, São Paulo, 49: 47-8.
- 92 — PEREIRA, C. — 1935 — Em torno da carpa. *O Biológico*, São Paulo, 1: 305-11.
- 93 — PEREIRA, C. — 1936 — A luta contra as moscas. *O Biológico*, São Paulo, 2: 236-41 e 315-22.
- 94 — PEREIRA, C. — 1937 — A luta contra as moscas. *Folheto n.º 83 do Inst. Biol.*, São Paulo, 32 páginas.
- 95 — PEREIRA, C. — 1937 — O zoo de São Paulo. *O Estado de São Paulo*, de 3 de dezembro.
- 96 — PEREIRA, C. — 1938 — Como evitar a cenurose. *O Biológico*, São Paulo, 4: 103-7.
- 97 — PEREIRA, C. — 1938 — O C. Z. B. e um Jardim Zoológico em São Paulo. *Bol. Biol. (Nova Série)*, São Paulo, 3: 174-5.
- 98 — PEREIRA, C. — 1938 — As atividades do Clube Zoológico do Brasil em defesa de nosso patrimônio faunístico. *Ibidem*, 3: 196-7.
- 99 — PEREIRA, C. — 1945 — A peste das cadeiras. *Página Rural*, Curitiba, 1: 12-4.
- 100 — PEREIRA, C. — 1950 — O caso Lisenko em face da Biologia. *Fôlha da Manhã*, São Paulo, 1, 8, 10, 13, 15, 17, 20, 22, 24, 27 e 29 de junho; 1, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 18, 20, 22, 25, 27, e 29 de julho; 1 e 3 de agosto.
- 101 — PEREIRA, C. — 1951 — Lissienço na biologia soviética. *Anhembi*, São Paulo, 4 (10): 26-42.
- 102 — PEREIRA, C. — 1951 — A propósito da biologia soviética. *Ibidem*, 4 (10): 103-14.
- 103 — PEREIRA, C. — 1951 — Mitchurinismo e método científico: *Rev. Paulista Med.*, São Paulo, 39: 456-62.
- 104 — PEREIRA, C. — 1955 — A herança vicentina no IV centenário. *Anhembi*, São Paulo, 17 (50): 289-96.
- 105 — PEREIRA, C. — 1957 — Flores só para homens. *Flores do Brasil*. São Paulo, 2 (3): 119-21.
- 106 — PEREIRA, C. — 1957 — A propósito da informação genética. *Anhembi*. São Paulo, 28 (83): 257-68.

MIGDOLUS MORRETESI LANE
(*COLEÓPTERO ANOPLODERMIDAE*)

UMA BRÓCA EVENTUAL DA CANA DE AÇÚCAR E DO EUCALIPTO

POR

José Pinto da Fonseca
Do Instituto Biológico de São Paulo

Com 8 figuras no texto e as estampas 1-2-3-4

Decorreram vinte e seis anos da primeira incidência de uma larva de coleóptero em cana de açúcar, provocando certa inquietação, tal a importância dos danos causados.

Durante todo esse tempo, acompanhamos as ocorrências do inseto, em diversas regiões do Estado, registrando seus ataques à cana de açúcar, ao eucalipto e a outras plantas de cultivo econômico.

Não conhecíamos o adulto. Jamais nos foi possível criar a larva por não sobreviver ela fora de seu ambiente natural.

Após duas décadas, casualmente, tivemos em mãos vários exemplares de um coleóptero Anoplodermídeo, e a circunstância por que foram encontrados nos induziu a suspeitar tratar-se de adultos da larva em aprêço.

Em julho de 1931, por intermédio do Dr. José Vizioli, então Diretor do Fomento Agrícola da Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo, provenientes da Usina Miranda, Pirajuí, neste Estado, recebemos vários exemplares de uma larva de coleóptero, acompanhados de toletes de cana que elas haviam atacado. O gerente daquela Usina, ao encaminhar o material para exame, solicitava medidas coercivas aos ataques do inseto. Nesta ocasião, foi-nos possível inspecionar os talhões atacados e verificar a natureza e a extensão dos danos causados.

Daí até 1943, ou seja, durante 12 anos, notícia alguma tivemos com referência às atividades do inseto.

Em julho de 1943, a Cia. Refinadora Paulista, de sua propriedade agrícola, em Tamoio, remeteu à Seção de Parasitologia Vegetal, raízes de eucaliptos atacadas por uma larva que, em grande quantidade, havia aparecido em alguns talhões e destruído 20.000 plantas de dois anos de idade.

Exemplares dessa larva, que vieram acompanhando o material atacado, apresentavam caracteres idênticos aos das larvas encontradas, em 1931, nos canaviais da Usina Miranda.

Em Tamoio, foi-nos possível realizar ligeiras observações, averiguar os ataques da broca, os quais se limitavam a uma área relativamente pequena, a dois talhões de eucaliptos, localizados em terreno de constituição extremamente arenosa.

Em setembro de 1948, aparecia a larva em outra região do Estado, próximo à estação de Laranja Doce (E.F.S.), na propriedade da Cia. Fazenda Brasilândia, atacando eucalipto. Também ali o grau de infestação apresentava-se elevado, havendo o inseto dizimado 15.000 eucaliptos, em talhão de 60.000 plantas, de três anos de idade, cultivadas em terreno de constituição idêntica ao de Tamoio.

Em julho de 1953, na mesma localidade, houve nova incidência da broca, agora sobre amoreira, de que foram eliminadas 5.000 estacas.

Em dezembro de 1956, na Fazenda Pedrinha, em Assis, o inseto atacou e destruiu uma cultura nova de videira.

Tratando-se de larva não identificada, desconhecida a forma adulta, e em face de sua presença em diferentes regiões do Estado, com prenúncio de se tornar praga das mais prejudiciais, sobretudo da cana de açúcar e do eucalipto, procurámos prestar maior atenção ao caso.

Inicialmente, orientámos pesquisas no sentido de se conhecer melhor o grau e a natureza dos ataques, a distribuição geográfica do agente depredador, a composição dos solos em que se encontravam as plantas atacadas, os hospedeiros naturais e a forma adulta do inseto.

Nas diversas zonas em que ocorreram as larvas, estas se localizavam em áreas bem delimitadas e em solos de idêntica constituição física, puramente silicosos, na forma de areia muito fina e extremamente permeáveis.

Os ataques ao eucalipto verificavam-se em plantas de seis meses a três anos de idade.

De junho a outubro é o período em que se têm registrado as atividades do inseto, denunciadas, no eucalipto, pelo murchamento lento e seca das folhas; na cana de açúcar, pela clorose acentuada da folhagem.

Em março de 1950, provenientes da Usina Miranda, em Pirajuí, recebeu o Sr. Benedito Luz Ribeiro, técnico dêste Instituto, exemplares de um coleóptero (adultos machos) e de larvas. Tratava-se de *Migdolus morretesi* LANE, família *Anoplodermidae*, segundo determinação do especialista Dr. Frederico Lane, do Departamento de Zoologia.

O material fôra coletado em diversos talhões de cana, já no

fim do ciclo vegetativo. Em algumas soqueiras, os danos eram mais severos, constando de grandes perfurações, a partir do colo da planta.

Segundo informações do Sr. José P. Pupo, agrônomo encarregado do setor agrícola da mencionada Usina, numa grande área em que se preparava o terreno para replanta da cana, observou-se certa quantidade de adultos (machos) dessa espécie, em atividade, voando ou perfurando o solo. Tal era a quantidade de besouros, que chegava a molestar os trabalhadores.

Em outubro de 1954, verificámos, novamente, ataques do inseto, em cana de açúcar, agora no município de Paraguaçu, Fazenda Santa Lina, Empresa José Giorgi Ltda.

Encontravam-se as larvas em núcleos esparsos, verdadeiras reboleiras, denunciados pela clorose da folhagem da cana. Ofereciam os ataques características idênticas àquelas observadas nos canaviais da Usina Miranda.

Em fevereiro de 1956, no mesmo local, houve novo surto do inseto. Nesta ocasião, também se preparavam os sulcos para a replanta da cana. A tardinha, sobreveio copiosa chuva. No dia imediato, durante o plantio, ao local acudiu o besouro (machos) em quantidade, a revoar pelo terreno, onde pousava, procurando, em seguida, o fundo dos sulcos, e penetrava na terra.

Coletaram-se machos e fêmeas. Estas, entretanto, não voavam, eram sempre apanhadas a vagar pelo solo. O exame de tais besouros veio positivar tratar-se de espécie idêntica à observada na Usina Miranda.

Nas regiões em que se vêm observando a presença de larvas do inseto, o solo é sempre constituído de areia extremamente fina, facilmente permeável, poucos obstáculos oferecendo a elas no seu possível transcurso subterrâneo, à procura de novas fontes de alimento. É interessante assinalar o fato de termos verificado, a pouca profundidade, vários canais entre uma e outra planta. Essas perfurações fôram realizadas, indubitavelmente, pelas larvas em seus propósitos migratórios. Assim, plantas novas de eucalipto, uma vez destruídas, possivelmente, passa a larva a atacar outras plantas, assim atuando, sucessivamente, até atingir o estágio de pupa.

O adulto parece exercer sua função ovipositora de janeiro a março, iniciando as larvas o ataque à planta a partir desse período.

Ataque: A larva, em plantas de lenho resistente, como o eucalipto, alimenta-se das partes corticais, liberianas e de grande parte

dos tecidos lenhosos. É inseto primário, porquanto a larva desenvolve-se em plantas vigorosas.

No eucalipto, o ataque sempre é iniciado no colo da planta. Em plantas mais velhas, cavam as larvas, ao longo das raízes, sulcos longitudinais, superficiais, pouco profundos, de largura proporcional ao diâmetro de seu corpo.

Os sulcos mantêm uma certa regularidade, nunca se bifurcando, conservam a mesma largura e a mesma profundidade, sempre em sentido longitudinal, numa só direção, atingindo, muitas vezes, a extremidade da raiz. Raramente, após certo percurso, volta a larva a trabalhar em direção oposta, abrindo galeria paralela à inicial. Outras vezes, interrompe o inseto o trabalho, reiniciando novo sulco um pouco mais adiante. Em seu avanço, ao longo do raiz, vai deixando para trás acúmulo de detritos fecais e de partes de tecido lenhoso arrancadas, que obstruem, por completo, as galerias.

Em seção transversal (Est. 2, fig. 2) apresentam-se os sulcos em forma mais ou menos semi-elíptica e medem cerca de 8-9 milímetros de largura e 6-8 milímetros de profundidade. A galeria segue curso regular, com a superfície interna ásperamente corroída, observando-se, além disso, saliências no lenho, o que demonstra, claramente, que a larva arranca fragmentos da madeira.

Em eucaliptos novos, parece-nos não ser uma única planta suficiente para alimentar o inseto em toda a sua fase larval. Assim, supomos, porquanto, em Tamoio, em inúmeras plantas mortas, de um ano de idade, muito atacadas, nenhuma larva foi encontrada, sendo provável que se tenham elas transferido, através do solo, a plantas vizinhas, ou a outras plantas mais afastadas. Esses percursos são, evidentemente, facilitados pela constituição puramente arenosa do terreno.

Na cana de açúcar, ataca o inseto os toletes e todas as partes subterrâneas da touceira, a partir do nível da terra.

PLANTAS HOSPEDEIRAS

As plantas hospedeiras, nativas, de *Migdolus morretesi* LANE, até o presente registradas, foram as seguintes: "Cipó vermelho", *Dolicarpus rolandri* J. P. GMEL. (Dileniaceae); "Cipó de São João", *Pyrostegia venusta* Miers, (Bignoniaceae); "Cipó branco" *Bignonia* sp., e *Adenocalymma paulistarum* Bur.) (Bignoniaceae).

Os três primeiros hospedeiros foram observados em Tamoio, e

o último, em Laranja Dôce. Provavelmente, constituem tais plantas os hospedeiros naturais do inseto.

São estas as primeiras observações que se conhecem acêrca de larvas de *Anoplodermidae*.

Foram GOUNELLE (1899) e BRUCH (1921) os primeiros entomologistas a registrarem alguns dados relativos às atividades biológicas dos adultos de duas espécies de *Anoplodermidae*.

O primeiro autor faz referência a *Migdolus fryanus* WESTWOOD, em observações realizadas em 1898, no Vale do Rio Pardo, São Paulo. Informa dever ter a fêmea vida subterrânea, e que ambos os sexos eram encontrados ao longo de pequenos caminhos, depois de chuvas. O macho era bastante vivo, voava bem, ao passo que a fêmea era áptera e lerda.

BRUCH, citando observações de DIURIONE, preparador do Museu de La Plata, realizadas em 1918, informa que a fêmea de *Migdolus orbignyi* BLANCHARD, fôra encontrada no solo a pouca profundidade, externamente, sôbre um montículo de terra certamente removida pela ação de penetração da fêmea. Capturou êle três machos, que procuravam penetrar na terra. Dias mais tarde, pela manhã, teve a oportunidade de coletar mais um casal da espécie. Desta vez, encontrava-se a fêmea com a metade do corpo fora da terra, e o macho ao redor dela, muito agitado. Um terceiro exemplar, fêmea, foi encontrado na terra, a 15 centímetros de profundidade.

Ainda informa Diurione que *Sypilus orbignyi* BLANCH. constitui espécie típica de regiões xerófitas.

Este costume, aliás, parece ser extensivo a todos os Anoplodermídeos, a julgar pelos hábitos de *Migdolus morretesi* LANE, espécie sempre observada nas proximidades de cerrados, em terrenos secos e arenosos.

Da forma adulta de *Migdolus morretesi* LANE, conhecia-se, unicamente, o macho, descrito por Frederico Lane, em 1927 (3).

O material de que se serviu o autor, em sua descrição, fôra capturado em Lussanvira, Estado de São Paulo.

Não se conheciam a larva e a fêmea dessa espécie, as quais, em seguida, passamos a descrever.

LARVA — Corpo branco-leitoso, mais alargado na região anterior, ligeiramente afilado para a posterior; superfície dorsal levemente convexa; superfície ventral plana; segmentos torácicos e abdominais bem distintos.

Pernas torácicas relativamente desenvolvidas; pernas mesotorácicas e metatorácicas rudimentares. Regiões dorsal e ventral dos segmentos abdominais 1.º e 5.º, desenvolvidas, em forma de calombo, com as expansões da região

dorsal mais ou menos oblongas, transversais, e as da região ventral lateral voltadas para a parte posterior do corpo, em arco, com o formato de meia lua (Estampa 3, figs. 1 e 2). Estas expansões, dos segmentos abdominais, funcionam como pseudópodes.

Cabeça — Mais larga do que longa, ligeiramente convexa na face superior, plana na inferior.

Mandíbulas — Robustas, curvas, cuneiformes, triláteras, com a extremidade apical terminada em ponta alargada, direita, levemente avançada para a parte inferior, cortante e com os cantos arredondados. Face externa ligeira e longitudinalmente convexa, com a margem superior, no terço apical, direita; margem inferior ligeiramente ondulada; região central mediana com caneladuras longitudinais; região apical de superfície plana, lisa e de bordos laterais cortantes; região basal com rugosidade transversal. Face superior côncava na metade apical, mostrando, na região central, fraca rugosidade transversal. Face inferior levemente côncava, na região basal mais larga do que a região correspondente da face superior; superfície lisa, no terço mediano com leve rugosidade. Côndilo dorsal perfeitamente globular. Os bordos que limitam as três faces das mandíbulas apresentam-se ligeiramente cortantes.

Labro — Transverso, curto, estreito na base, alargado nas regiões laterais: margem anterior arqueada; superfície superior plana; superfície inferior convexa. Ambas as superfícies são providas de numerosas cerdas afiladas para a extremidade apical, apresentando ligeira constrição na região basal, junto à implantação. Nas margens anterior e laterais da região superior, as cerdas se apresentam mais numerosas, mais desenvolvidas e voltadas para fora. Na face inferior, as cerdas são em maior quantidade, mais robustas e dirigidas para a região central do processo.

Clípeo — Bem distinto, alargado na base, mais estreito na margem anterior, trazendo, de cada lado, na região central transversal, sete a doze cerdas pardacentas, robustas, alongadas e afiladas para a região apical. Estas cerdas, vistas com maior aumento, apresentam-se implantadas na extremidade de elevações em forma de rugas digitiformes, alongadas, longitudinais, às quais se tornam, gradativamente, menores da região central para as extremidades laterais do clipeo. Na região basal do clipeo, há, de cada lado, pequenas cerdas em número de quinze a dezoito.

Epístoma — Margem anterior reta, ligeiramente ondulada; cantos externos salientes e arredondados; superfície superior plana, glabra; partes laterais, na altura da inserção das antenas, com pêlos finos e procumbentes.

Fronte — Região central alta, em sentido longitudinal; regiões laterais levemente depressas; margem anterior avançada para a frente, em ponta obtusa, alcançando a metade da largura do epístoma. Toda a superfície da fronte é lisa e glabra.

Lábio inferior — Mento tão largo quanto longo; superfície inferior plana, truncada na região anterior; na região central, em sentido longitudinal, observa-se fraca depressão ocupando dois terços do comprimento do mento; regiões laterais abauladas, contendo, anteriormente, pequeno acúmulo de pêlos

cerdiformes, curtos e direitos; hipofaringe em forma de V, com o vértice voltado para a parte anterior; regiões laterais salientes, elevadas, abauladas para a parte externa, deixando, entre si, uma cavidade larga, profunda e alongada. Sobre o terço ântero-inferior das regiões laterais do processo, notam-se numerosos pêlos cerdiformes, robustos e eretos. Dêstes pêlos, os do centro são os mais desenvolvidos. Palpos labiais biarticulados; 1.º articulo cilíndrico, tão largo quanto longo, ligeiramente mais longo no lado externo do que no interno; no lado externo, junto à extremidade apical, notam-se três pêlos cerdiformes, procumbentes; articulo apical cilíndrico, largo na base, atenuado para a extremidade apical, terminado em ponta obtusa, provida de diminutos espinhos muito curtos e eretos. O tamanho dêste articulo é a metade do comprimento e da largura do primeiro articulo. Submento com o formato de meia lua, plano no lado superior, estreito na região basal, alargado nas regiões laterais, desenvolvido na frente até a altura em que se articula com o mento e a lígula, dêstes se separando por sulcos bem evidenciados. Visto pela região inferior, apresenta-se alargado na base, atenuado para a região anterior, com os cantos laterais basais arredondados.

Maxilas — Membrana de articulação de formato oblongo, ligeiramente alongada; superfície plana; margem interna mais ou menos direita; margem externa em curvatura pronunciada; extremidades anterior e posterior, arredondadas. No terço anterior da membrana, observa-se uma ligeira dobradura transversal e pêlos curtos, esparsos. Cardo triangular; margem posterior ligeiramente mais alongada do que as margens anterior e interna; canto externo agudo; canto anterior arredondado; margem anterior com pêlos curtos e eretos. Estipe plano na superfície superior, convexo na face inferior basal; face superior provida de pêlos finos, procumbentes; face inferior com leve rugosidade transversal; margem anterior externa saliente, formando, anteriormente, uma intumescência mais ou menos pronunciada. Palpífero, visto de lado, intumescido na região basal, depresso para a região anterior; região ventral basal levemente saliente; região superior, plana. Sobre toda a superfície do palpífero nota-se fina pilosidade dirigida para a frente, pilosidade esta que, entretanto, se apresenta acumulada e mais desenvolvida na região mediana externa do órgão. Subgálea depressa, externamente triangular, mais longa na margem externa, a qual se projeta em ponta arredondada no canto interno junto aos palpos; margem anterior provida de longas cerdas espiniformes, que se tornam menores à proporção que se aproximam da região central do processo; todas as cerdas acham-se voltadas em direção à região anterior do órgão; região interna plana; região central provida de diminutos pêlos curtos, espiniformes.

Lacínia alargada na base, afilada para a extremidade apical, voltada em direção aos palpos; margem interna direita, externa em arco bem pronunciado; superfície externa levemente côncava, interna ligeiramente plana; extremidade anterior em ponta obtusa, arredondada. Na margem anterior da superfície externa implantam-se cerdas mais curtas, mais robustas, terminadas em ponta obtusa; outro agrupamento de cerdas acha-se implantado externamente, junto à orla marginal do processo, composto de cerdas mais longas, afiladas para a extremidade apical, indistintamente distribuídas e procumbentes. Estas cerdas apresentam-se mais desenvolvidas junto ao canto basal do processo.

Palpo com três artículos, todos de diâmetro decrescente da região basal para extremidade apical. Primeiro artículo cilíndrico, mais largo do que longo; sobre a margem apical do primeiro artículo, numerosos pêlos curtos, eretos; segundo artículo tão largo quanto longo, cilíndrico, com um ou dois pequenos pêlos implantados na margem externa; terceiro artículo, digitiforme, mais longo do que largo, ligeiramente afilado para a extremidade apical, terminado em ponta obtusa, trazendo esta diminutos espículos.

Antenas — Compostas de quatro artículos, cilíndricos; artículo basal tão longo quanto os demais artículos reunidos, levemente entumecido na base, com duas vezes o diâmetro dos demais artículos reunidos, provido de fracos sulcos longitudinais; segundo artículo ligeiramente mais curto do que o artículo basal, com pouco mais de duas vezes o comprimento do terceiro artículo e de uma só espessura em toda a sua extensão; terceiro artículo duas vezes mais longo do que largo, com a extremidade apical interna avançada para a frente em ponta obtusa; quarto artículo muito diminuto, quase tuberculiforme, com a extremidade apical truncada e provida de alguns diminutos espinhos.

Tórax — Robusto, mais alto e mais largo do que o abdômen.

Protórax — Em declive para a região cefálica; tanto alto quanto largo, abaulado superiormente; margem anterior superior ligeiramente bisinuada; região central levemente plana; região lateral superior arredondada; placa dorsal plana, trazendo depressões e elevações fracas, formando estruturas e desenhos característicos, conforme se vê na figura. Desses desenhos, sobressai o que se encontra na região central, o qual se apresenta de formato arredondado, trazendo, no centro, leve sulco longitudinal. Posteriormente a esses desenhos, observam-se, de cada lado, dispostas em sentido transversal, quatro linhas mais ou menos direitas, finas, salientes e de coloração pardo-avermelhada. Dessas linhas, a do canto é a mais longa e as duas imediatas, anterior e posterior, de tamanho igual; a linha anterior, a menor de todas, apresenta-se em posição ligeiramente oblíqua. Em alguns indivíduos, tomam tais linhas uma coloração pardo-avermelhada. Limitando a placa dorsal, observa-se, anteriormente, uma estria constituída por uma acumulação de pêlos muitos finos, dirigidos para a região anterior do pronoto. Esta estria aparece estreita na região central e alargada nas regiões laterais do processo. Entre as quatro estrias salientes transversais, nota-se uma pilosidade delicada, densa, pardacenta. Região inferior, ligeiramente plana; margem anterior levemente ondulada, com ligeira e curta depressão em cada lado, entre a margem anterior e as pernas; região externa formada por três fracas elevações que ocupam a metade anterior do processo, sendo uma subcentral arredondada e duas laterais, de formato mais ou menos oblongo, limitadas, aos lados, pela base das pernas. Posteriormente a estas elevações laterais, observam-se, em cada lado, duas profundas depressões localizadas em sentido transversal, mais alargadas na região interna, estreitadas para a região externa e tocando na base da inserção das pernas. Posteriormente, em sentido transversal, encontram-se quatro linhas salientes, de disposição e formato idênticos aos observados na região dorsal do pronoto; post-esternelar de formato conforme mostra a figura; hipopleural mais longo do que largo, bem definido; epipleural com

leve constrição na região central superior, alargado para as extremidades anterior e posterior.

Mesotórax — Tão largo quanto o pronoto; área escutelar mais estreita do que as áreas pleural e external. A área escutelar apresenta-se indivisível, revelando, unicamente, pequena dobra em cada lado, na região superior; lobos epipleurais pouco distintos, fracamente elevados. Região inferior ligeiramente convexa, de uma só largura; lobos externos e esternelares pouco definidos. O primeiro apresenta-se estreitado na região mediana anterior, mais alargado para as regiões laterais; o segundo, ao contrário, é alargado na região mediana, afilado para as regiões laterais. Na região central, junto à junção do pronoto com o mesotórax, observa-se pequena depressão puntiforme e profunda.

Metatórax — Região dorsal ligeiramente mais larga do que o mesotórax; região ventral apresentando, no restante, as mesmas características daquele segmento.

Abdomen — Segmentos 1.º a 6.º, na região dorsal, bem entumecidos, salientes para a região posterior do abdômen. Dessas excrescências, as duas primeiras, correspondentes aos dois primeiros segmentos do abdômen, apresentam-se transversais, mais largas do que longas; os três segmentos, superiormente, são de formato mais ou menos globular, e o último de tamanho reduzido; segmentos 7.º e 9.º, cilíndricos, de tamanho igual; região pleural com esternites bem evidenciados; lobos hipopleurais perfeitamente assinalados nos segmentos 7.º e 9.º; epipleurais sobre os segmentos 7.º e 9.º, formando uma saliência estreita, transversal, abaulada, abrangendo toda a região lateral dos segmentos.

Região inferior plana, estreitando-se, gradativamente, para a extremidade posterior do abdômen. Segmentos 1.º e 2.º mais curtos e mais largos do que os restantes. Todos os segmentos apresentam entumescências lobuliformes, projetadas lateralmente. Estas excrescências, a partir do 2.º ao 5.º segmentos, são arqueadas, em forma de meia lua, com a convexidade voltada para a região posterior do abdômen e tendo as extremidades arredondadas e bem salientes; 6.º a 8.º segmentos com a região esternelar longitudinalmente depressa, lateralmente com leve entumescência arredondada; segmento 9.º de formato globular; lobo subanal indistinto; lobos paranaís mais longos do que largos, ligeiramente entumecidos nas regiões laterais; lobo supra-anal menos desenvolvido do que os precedentes, mostrando, em cada lado, duas profundas incisões que não alcançam a região posterior do lobo; região central levemente elevada em sentido longitudinal.

Aos lados da região dorsal do corpo da larva, observam-se, ainda, sobre cada segmento, em sentido longitudinal, longas e estreitas depressões: uma no centro, duas aos lados sobre o 1.º e 2.º segmentos e duas de cada lado sobre os segmentos 4.º a 6.º. As expansões ventrais sobre os segmentos 2.º a 5.º trazem, de cada lado, na extremidade posterior, dois sulcos formando a letra V, com o vértice voltado para a região anterior.

Pernas do primeiro par — Relativamente desenvolvidas; coxa globuliforme, mais larga do que longa; face inferior mais larga do que a superior, trazendo, na margem superior central, uma reentrância bem acentuada; fêmur mais longo do que largo, depresso para a região inferior, cuja extremidade

terminal é arredondada e provida de pêlos curtos; região superior mais curta do que a inferior, apresentando-se esta três vezes mais longa do que a superior e terminada em ponta arredondada. Tibia ligeiramente menos longa do que o fêmur, porém de formato idêntico a este e com a extremidade anterior um pouco mais afilada. Tarso digitiforme, mais longo do que largo, arqueado na sua margem superior. Unha quase tão longa quanto o tarso, levemente curvada na extremidade apical. Todos os segmentos da perna do primeiro par trazem, ao longo da região posterior, uma série de pequenos pêlos espiniformes, eretos, sendo os da extremidade apical mais desenvolvidos.

Pernas do segundo par — Coxa com a face superior mais curta do que a inferior. Esta última face acha-se provida de pêlos setiformes, procumbentes. Fêmur quase duas vezes mais longo do que largo, com a margem superior direita, a inferior ligeiramente entumecida na região basal. Junto à extremidade superior observam-se, no lado inferior, três a quatro pêlos cerdiformes, procumbentes. Tibia ligeiramente mais longa e mais delgada do que o fêmur, ligeiramente arqueada no lado superior e com os lados paralelos, ligeiramente aproximados para a extremidade apical. Junto à extremidade superior, na base da junção da tibia com o tarso, há, de cada lado, uma ou duas cerdas alongadas, dirigidas para frente, ultrapassando o tarso em comprimento. Tarso uniarticulado; unha medindo quase duas vezes o comprimento do tarso e o da tibia, ligeiramente arqueada, alargada na base, extremamente afilada para a região apical. Coxa curta, duas vezes mais larga do que o trocânter.

Pernas do terceiro par — Tão longas quanto as do segundo par: coxa duas vezes mais longas do que o trocânter e quase três vezes mais larga do que este último; região interna basal provida de leve incisão. Região inferior da coxa com pêlos esparsos. Trocânter curto na região superior, na região inferior quase tão largo quanto o fêmur, tendo, na região inferior, pêlos cerdiformes, procumbentes. Fêmur quase duas vezes mais longo do que o trocânter, alargado na região basal, levemente atenuado para a região apical; margem superior quase direita; margem inferior ligeiramente entumecida no terço basal, com pêlos setiformes, robustos, procumbentes na extremidade apical da região inferior. Tibia ligeiramente mais longa do que o fêmur, de lados mais ou menos paralelos. Tarsos e unhas idênticos aos do 2.º par de pernas.

Dimensões — Os exemplares mais avantajados medem 4 a 5 centímetros de comprimento, e 8 mm a 11 mm de largura, por 5 a 8 mm de altura.

FÊMEA — A fêmea de *Migdolus morretesi* LANE, até então desconhecida, difere do macho pelos caracteres seguintes: Tamanho menor, côr ferrugínea clara e uniforme, áptera.

Cabeça — Região transversal entre os tubérculos da base das antenas, menos profunda e com pontuação mais serrada; região entre as mandíbulas mais ampla e mais profunda, com a margem anterior nitidamente bissinuada; região entre os olhos menos elevada e mais ampla. Mandíbulas menores e mais largas. Labro mais plano, arredondado na margem anterior e provido de cerdas mais espaçadas. Epístoma menos elevado. Vértice plano, com leve depressão transversal. Palpos maxilares do comprimento das mandíbulas, os artículos 1.º e 2.º, subiguais, 3.º e 4.º menores, subiguais. Palpos labiais com

o 1.º e o 2.º artículos maiores, subiguais, e os 3.º e 4.º artículos, subiguais. Antenas curtas, não excedendo as mandíbulas em comprimento, providas de 8 segmentos, medindo de comprimento 4 mm; escapo encorpado, oblongo, duas vezes mais longo do que largo, com pontuação grossa, dispersa trazendo, cada ponto, uma cerda curta e procumbente; 2.º segmento anular, tão longo quanto largo, mais alargado para a extremidade apical, 3.º segmento quase tão longo quanto os segmentos 1.º e 2.º, reunidos, e se apresentam progressivamente dilatados para a extremidade apical; 4.º segmento ligeiramente menos longo e ligeiramente mais dilatado do que o segmento precedente; 5.º, 6.º e 7.º segmentos subiguais, ligeiramente menores do que os segmentos 3.º e 4.º; 8.º artículo oblongo, ligeiramente mais longo do que os segmentos 5.º, 6.º e 7.º. Olhos castanhos-escuros, pequenos, oblongos, não envolvendo as antenas.

Pronoto — Mais convexo, ligeiramente lustroso e mais longo do que largo, provido de pontuação mais grossa, mais esparsa e uniforme; bordo anterior avançado sobre a cabeça e apresentando leve constrição transversal, situada entre os cantos laterais; margem marginada; cantos laterais arredondados; margem posterior levemente marginada.

Escutelo liso, tão largo quanto longo, terminado, posteriormente, em ponta obtusa.

Élitros — De comprimento quase duas e meia vezes maior que o do pronoto, desprovidos de rugas, trazendo, unicamente, pontuação mais grossa e mais serrada que o pronoto; margem sutural levemente marginada no terço posterior; cantos laterais perfeitamente arredondados; área terminal ligeiramente convexa no centro, margem anterior fortemente marginada; área intercoxal longitudinalmente convexa, achando-se toda ela provida de pontos grossos, cada um dos quais tem um pêlo curto, fulvescente e procumbente.

Asas rudimentares, muito estreitas, impróprias ao vôo.

Área episternal ligeiramente plana, com pontuações grossas e margem interna levemente marginada.

Metasterno luzidio, provido de pontuação escassa e dispersa, cada ponto com um pêlo fino, recumbente e fulvescente; linha sutural mediana muito estreita; margem posterior levemente marginada.

Epímero estreito; glabro, com a margem anterior marginada. Epísterno triangular, glabro e provido de pontuação grossa.

Pernas — Relativamente menores, com os tarsos muito curtos. Tibias anteriores com a margem externa distintamente mais dilatada e finamente denticulada.

Esternites glabros e pouco luzidios.

Comprimento: Da extremidade das mandíbulas à extremidade do abdômen, 25 mm; largura humeral, 9 mm.

O material de que nos servimos para a presente descrição, constava de quatro exemplares provenientes de Paraguaçu, Estado de São Paulo.

A ninfa é desconhecida.

O macho, exemplar tipo da espécie, foi descrito por Frederico Lane em 1937 (3).

AN OCCASIONAL BORER OF SUGAR-CANE AND EUCALIPTUS

Abstract

The larva and the female of *Migdolus morretesi* LANE (Coleoptero Anoplodermidae), from the State of São Paulo, Brazil, are described for the first time.

The subterranean larva was found to feed on the roots of the following plants: *Eucalyptus* spp., Sugar-cane, Grape, mulberry, "Cipó vermelho", *Dolicarpus rolandri* Cmel. (Dileniaceae); "Cipó branco", *Bignonia* sp.; *Adenocalymma paulistarium* Burm. (Bignoniaceae), and "Cipó de São João", *Pyrostegia venusta* Miers, (Bignoniaceae).

BIBLIOGRAFIA

- BRUCH, C. — 1921 — Algunos interesantes Cerambicidos. *Rev. Mus. La Plata*, 25: 345-356.
- GOUNELL, E. — 1899 — Note sur le genre *Migdolus* et description de la femelle du *Migdolus fryanus* Westw. *Bull. Soc. Ent. France*, p. 6 e 221.
- LANE, F. — 1937 — Esboço Monográfico dos Anoplodermideos. *Rev. Mus. Paulista*, 23: 171-172; 197-201.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 1

Fig. 1 — Canas atacadas pela larva de *Migdolus morretesi* LANE.

Estampa 2

Fig. 1 — Raízes de eucaliptos, de seis meses a dois anos, atacadas pela larva.
Fig. 2 — Raiz de eucalipto (seção transversal e longitudinal) com o sulco produzido pela larva (Tamanho natural).

Estampa 3

Fig. 1 — Larva de *Migdolus morretesi* LANE, vista ventral, dorsal e lateral.
Fig. 2 — Larva de *Migdolus morretesi* LANE, cabeça e protórax, vista dorsal.
Fig. 3 — Idem, protórax, vista dorsal e ventral.
Fig. 4 — Mandíbulas: a, face externa; b, face dorsal; c, face ventral.
Fig. 5 — A - Cabeça; A, aspecto dorsal; a, labro; b, clipeo; c, epistoma; d, antena; e, palpo maxilar. B - Aspecto ventral; a, mento; b, submento; c, área do lóbulo submental; d, maxila; e, palpo maxilar. C - Maxila, face superior - a, palpo maxilar; b, palpífero; c, estípe; d, lacinia; e, subgália. D - idem, face inferior. E - palpo maxilar.
Fig. 6 — Antena.
Fig. 7 — Pernas — A, primeiro par; B, segundo par; C, terceiro par.

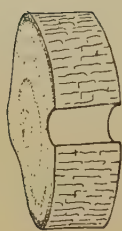
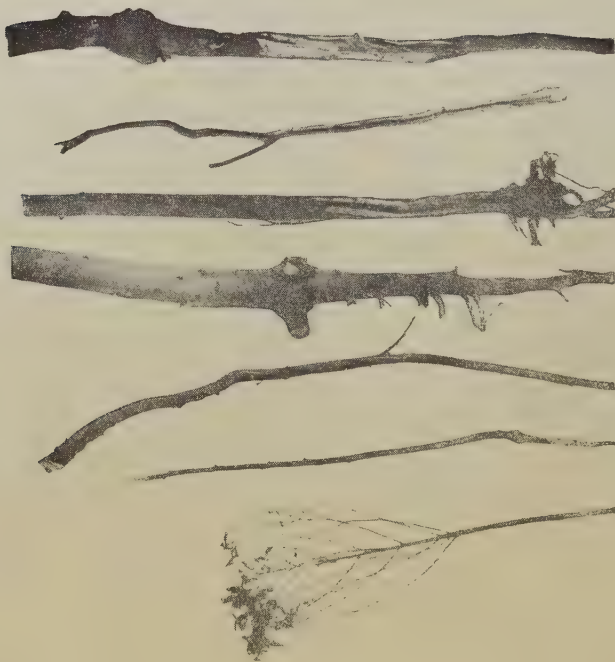
Estampa 4

Fig. 1 — Larva de *Migdolus morretesi* LANE, vistas dorsal e lateral.
Fig. 2 — Idem, adultos, macho e fêmea.

J. Pinto da Fonseca
Migdolus morretesi Lane

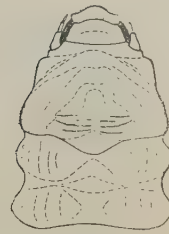
Arq. do Instituto Biológico, Vol. 25
Estampa 1







1



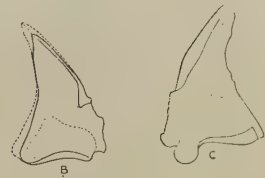
2



3



6



B

C

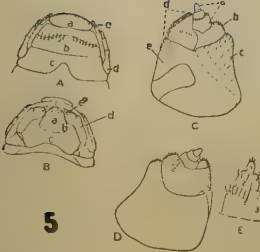
4



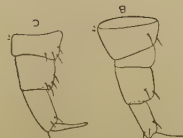
A



12



5



C

B

7



J. Pinto da Fonseca
Migdolus morretesi Lane

Arq. do Instituto Biológico, Vol. 25
Estampa 4



MULTIPLICAÇÃO E EFEITO CITOPATOGÊNICO DO VIRUS DA FEBRE AFTOSA EM CULTURA DE TECIDO RENAL (*)

POR

M. P. de Castro, D. de Mello e J. C. de Queiroz

Do Instituto Biológico de São Paulo

(Sob os auspícios do Conselho Nacional de Pesquisas)

Com 6 tabelas no texto

INTRODUÇÃO

Os trabalhos de HECKE e dos MAITLAND (25, 26, 35), demonstrando a possibilidade de cultura do vírus aftoso em tecidos "in vitro", deram origem a duas linhas de pesquisas que, visando o mesmo fim, isto é, o conhecimento do comportamento biológico do vírus, sua produção em larga escala para produção da vacina e métodos precisos para diagnóstico e titulação, divergem, no entanto, pela base. HECKE cultivou o vírus aftoso em cultura de tecido, onde as células eram mantidas em plena atividade metabólica e proliferativa, se bem que, também, observara que a multiplicação do vírus não dependia do grau de proliferação celular. MAITLAND & MAITLAND, na mesma época, independentemente, demonstraram a multiplicação do mesmo vírus em tecidos mantidos em sobrevivência temporária. Em seguida a êsses trabalhos, numerosos pesquisadores não só confirmaram a possibilidade de cultura do vírus em tecidos sobreviventes (4, 12-21, 27, 28, 29, 30, 32, 42, 59, 62), e chegaram a produzi-lo em massa para o preparo de vacina (11-21, 28, 29, 54, 62), como verificaram a manutenção de sua virulência através de numerosas passagens (12, 25, 26), e de seu poder antigênico (29); além disso, traçaram o esboço da sua curva de multiplicação (20, 27, 33, 59), o que, indubitavelmente, constituiu o primeiro passo para o conhecimento do vírus. No entanto, os resultados discrepantes, muitas vezes obtidos, por um mesmo pesquisador, em culturas paralelas, não poderiam dar uma exata compreensão das interrelações vírus-célula, porque, dada a própria complexidade do sistema, vários fatores contribuiriam para mascarar a verdadeira curva de multiplicação do vírus.

A aplicação do processo de Rous & JONES (55), para a obtenção de suspensões celulares a partir de órgãos e tecidos normais (3, 9, 10, 41, 51, 52, 55, 63, 64), que permitiu a maior facilidade de prepara-

(*) Recebido para publicação em 17 de setembro de 1958.

ção de culturas em réplicas, aliada a estudos das exigências culturais dos vários tipos de célula e a análise dos meios naturais que levaram ao desenvolvimento dos meios sintéticos e semi-sintéticos, foram as alavancas que removeram a virologia citológica do seu impasse.

Em seguida, a demonstração da sensibilidade de vários tipos de células "in vitro", não normalmente afetadas por um determinado vírus "in vivo" (11), sensibilidade esta, facilmente observável pela concomitante citopatogenicidade (53), revelou ainda, novo filão a ser explorado: tentativas de cultivar o vírus em outros tecidos que, por serem mais facilmente desintegráveis sob a ação da tripsina, mais se prestariam à padronização da técnica. Foi assim que SELLERS (56) e BACHRACH et Al. (1) demonstraram a multiplicação do vírus aftoso em cultura de células de rim bovino e suíno, e PAY (44, 45), em células amnióticas e linguais bovinas. A cultura em células renais nos pareceu a mais vantajosa, tanto pelo grande número de culturas preparáveis com um único rim (1) como pelo grande predomínio de elementos epiteliais, hospedeiros obrigatórios do vírus aftoso "in vitro" (14, 21, 31, 43, 56).

Apresentamos, neste trabalho, nossa experiência com os tipos "A", "O" e "C" em cultura de tecido renal bovino e suíno. Anteriormente (6) havíamos cultivado os tipos "C" e "O" em tecido renal de cobaia, sistema que abandonamos, depois da verificação de que os dois sistemas, adotados no presente trabalho, são perfeitamente utilizáveis, um para a multiplicação do vírus e outro para a sua titulação e tipagem.

Desejamos agradecer a E. E. Trapp pelas provas de fixação de complemento, a M. Siqueira pelos sôros imunes específicos e a C. Pereira pela leitura dos originais e sugestões.

MATERIAL E TÉCNICA

Suspensões de vírus aftoso tipos "A" e "O" de VALLÉE e "C" de WALDMAN, preparados com epitélio virulento bovino, por trituração em areia lavada, em diluição 1:5, foram previamente tipados por prova de fixação de complemento e por sôro-neutralização em culturas de células renais de cobaia. Para as passagens em cultura, usamos inóculo diluído a 1:10 ou 1:100 em solução a 0,5% de hidrolisado de lactalbumina em solução de HANKS, com pH 7,6: 0,1 ml para tubos de 16 × 150 mm, 1 ml para frascos de xarope de 150 ml de capacidade e 10 ml para garrafas de Roux de 1 litro de capacidade.

Sôros específicos preparados na Seção de Imunologia do Instituto Biológico, segundo os padrões de Pirbright.

Material celular obtido de rins de vitelo e de leitão colhidos em matadouro e guardados em geladeira (cêrca de 4° C) de 12 a 24 horas.

Solução de HANKS (24) com pH 7, 6-7, 8.

Solução de tripsina 1:250 a 0,2% em solução de HANKS.

Meio de cultura para multiplicação celular (40): hidrolisado lactalbumina 0,5%, sôro normal de vitelo (inativado por meia hora a 56°C) 10%, em solução de HANKS, com pH final 7,6.

Antibióticos: 100 unidades/ml de Penilicina potássica.

100 mcg/ml de Didroestreptomicina.

Meio para inoculação de vírus: Hidrolisado de lactalbumina 0,5%, sôro normal de cavalo (inativado por meia hora a 56° C) 2%, em solução de HANKS. Em alguns experimentos acrescentamos tris(hidroximetilaminometana) na concentração de 0,969 g/litro, para se obter melhor estabilidade do pH (47, 49, 58).

Para a obtenção das suspensões celulares usamos a seguinte técnica: fragmentos da cortex renal, depois de lavados em solução de HANKS, eram incubados durante uma hora a 37° C, cêrca de 20 ml da solução de tripsina para cada 4 g de material. Em seguida, a solução velha de tripsina era substituída por outra fresca. Nesta fase, duas alternativas puderam ser seguidas: ou a agitação, para auxiliar a desintegração do tecido, era feita no mesmo dia, ou então no dia seguinte. Neste caso os fragmentos imersos na solução de tripsina eram conservados à temperatura de 4° C. Em ambos casos conseguimos boas culturas. Em geral, com 4 ou 5 extrações de uma hora, conseguiam-se desfazer completamente os fragmentos, restando apenas os seus estromas conjuntivos. A suspensão celular era, então, centrifugada a cêrca de 1.000 rev/min., durante 15 a 20 minutos e ao sedimento acrescentava-se sôro normal de vitelo (inativado a 56° C por meia hora) para assegurar a inativação da tripsina (5): depois de 20 a 30 minutos à temperatura ambiente, fazia-se nova centrifugação a baixa rotação para eliminar o excesso de sôro, e o sedimento era resuspenso no meio de cultura na proporção de 1:100, 1:150 ou 1:200 e distribuído na razão de 1 ml por tubo de 16 × 150 mm., 10 ml para frascos de 150 ml e 100 ml para garrafas de 1000 ml. Tanto os frascos como os tubos foram deixados em temperatura de 36 a 37° C, estacionários. Em culturas de rim de leitão, feitas com suspensões a 1:100, a confluência se dava do 3.º ao 4.º dia podendo, desde logo, serem usadas para os ensaios. As suspensões mais diluídas deram culturas confluentes com 6 a 7 dias.

As culturas de maior concentração inicial exigiram, a partir do 3.^o dia, que o meio fôsse renovado. As culturas de rim de vitelo apresentaram crescimento um pouco mais lento e não viraram tão depressa a cor do indicador de pH, apesar de estarem geralmente confluentes no 7.^o dia.

Muitas vezes se usou outra alternativa, principalmente para as culturas de rim de vitelo. Uma vez obtido o sedimento de células, êste era suspenso em meio de cultura completo, na proporção de 1:20, e conservado em geladeira. Isto permite preparar culturas durante até quatro dias (39).

As titulações em camundongo e em cultura de células suínas foram feitas usando-se diluições múltiplas de dez, e calculando-se depois a diluição limite infectante que causou morte em sete dias ou efeito citopatogênico total em 36 horas, para camundongos e culturas de tecido, respectivamente (50).

RESULTADOS

Em culturas de células de rim de leitão — Verificamos o desenvolvimento do efeito citopático até a destruição de tôdas as células das culturas frente aos três tipos de vírus. Na primeira leitura, com 18 horas de incubação, já era possível evidenciarem-se os tubos positivos, mas neste tempo o efeito citopatogênico era ainda pequeno nas diluições limites. Depois de 36 horas a leitura se tornava mais fácil, porque não havia, com raríssimas exceções, tubos intermediários. Neste tempo, ou as culturas infectadas se apresentavam tão normais como as testemunhas ou se apresentavam completamente destruídas e com grande maioria das células descoladas da parede do tubo de cultura. Êste efeito era sempre ausente nas culturas inoculadas com mistura vírus-sôro imune. Foi possível verificar-se que, principalmente quando se utilizavam culturas velhas, isto é, com mais de vinte dias, depois das 36 horas de exposição ao vírus, permaneciam aderidas algumas células fibroblásticas.

Em culturas inoculadas com mistura sôro-vírus e que não apresentaram efeito citopatogênico depois de 36 horas, quando inoculadas com vírus tipo oposto, não sofreram o efeito citopático. Mas, em culturas inoculadas com vírus morto pelo calor (56° C 1 hora) que não apresentavam nenhum sinal de necrose celular, quando tratadas por outro tipo de vírus, manifestou-se o efeito citopatogênico típico (Tab. I).

Em culturas de células de rim de vitelo — Frente ao vírus tipo "A", as células bovinas exibiram o mesmo tipo e extensão de

efeito citopatogênico que para as células de leitão. Com os tipos "O" e "C" as culturas exibiram efeito citopático de pequena extensão, observando-se pequenos focos de necrose e células necróticas esparsas no lençol epitelial contínuo e de aparência normal.

Em culturas tratadas por êsses dois tipos, e que tiveram durante vários dias os seus meios de cultura renovados periodicamente, houve franca recuperação, sem aparecimento de novos focos necróticos.

Culturas infectadas com os tipos "C" e "O", quando expostas ao tipo "A", em concentrações que destruíram tôdas as células das culturas normais testemunhas, mantiveram-se aparentemente normais (Tab. I).

Fizemos 15 passagens do tipo "C", que corresponde à diluição do inóculo inicial a 10^{-29} . Com material virulento resultante da 12.^a passagem, cujos títulos foram $DL50\ 10^{5.67}/ml$ e $TCID50\ 10^{6.67}/ml$, preparou-se uma vacina monovalente, segundo a técnica de WALDMANN (60). Inoculamos 8 ml desta vacina, dose que corresponde a um milhão de doses letais cinquenta por cento para camundongos, em cinco bezerros com 7 a 8 meses de idade. Quinze dias depois, inoculamos 0,4 ml de vírus de cultura nestes cinco animais e em outros cinco, não previamente vacinados, por via intradérmica, na língua. Trinta e seis horas depois, observamos a formação de aftas primárias e sialorréia em ambos grupos de animais. Mas, os não vacinados apresentaram-se febris, com $0,7^{\circ}C$ acima da média dos animais vacinados. Esta diferença de temperatura se manteve até o 6.^o dia depois da inoculação. No quarto dia, todos os animais não vacinados apresentaram lesões aftosas nas quatro patas, enquanto que em nenhum dos vacinados apareceu sintomas de generalização, ainda que observados por mais de seis dias (Tab. II).

A fixação de complemento do material colhido das aftas primárias demonstrou tratar-se de infecção pelo vírus tipo "C", e as titulações em cultura e em camundongo indicaram um aumento de infectividade para camundongo e manutenção de título em cultura (Tab. III). Essa diferença não nos pareceu significativa, dada a maior variação observada nos títulos obtidos em camundongo, quando comparados com os obtidos em cultura.

A introdução do tris(hidroximetilaminometano) no meio de cultura não interferiu com a fixação de complemento nem com o rendimento de vírus, e apresentou a vantagem de manter o pH ótimo por maior número de horas, o que talvez explique o aumento de título nas culturas de 22 dias (Tab. IV).

Em geral, observamos que culturas de 10 a 15 dias dão mais altos títulos do que as com mais de 20 dias (Tab. IV).

Tentativas de obtenção de vírus mais concentrado, usando menor quantidade de meio (50 e 20 ml por garrafa de Roux), não deram resultados satisfatórios. Observamos que nas culturas assim tratadas havia viragem muito rápida da cor do indicador, o que, provavelmente, conduziu à inativação das partículas de vírus já liberadas (Tab. V).

A repetição da titulação de amostras de vírus, antes e depois de serem mantidas congeladas a — 30° C durante um a dois meses, sem adição de qualquer substância conservadora extra, demonstrou ótima conservação da infectividade (Tab. VI).

Fizemos, ainda, 7 passagens do tipo "A", e 3 do tipo "O", cujos títulos se mantiveram altos, tanto para camundongos como para cultura de tecido suíno (Tab. III).

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Tropismo do vírus aftoso em cultura de tecidos — KÖBE e FERTIG (31), trabalhando com culturas puras de epitélio de íris e com culturas mistas de pele embrionária de cobaia, observaram a multiplicação do vírus aftoso com a concomitante destruição das células epiteliais; os fibroblastos eram poupados pelo vírus, fato que mais tarde foi confirmado (43). KOEFOED (32) conseguiu a cultura do vírus em fragmentos de membrana amniótica e de pele de cobaia e não em fragmentos de rim cultivados *in vitro*. A possibilidade de cultura do vírus foi ainda amplamente provada em fragmentos de epitélio lingual bovino (12-21). Recentemente, foi demonstrado que células resultantes da digestão triptica parcial de membrana amniótica (44), de fragmentos epitélio lingual (45), de pele (8) e de rim bovino e suíno e de cobaia (1, 6, 56) também permitem a multiplicação do vírus. Em resumo, membrana amniótica, pele e epitélio lingual, tanto como fragmentos sobreviventes como em cultura, servem para a instalação e a multiplicação do vírus. O mesmo não parece acontecer com fragmentos de rim em sobrevivência (32), talvez porque estes se comportem, quando mantidos em sobrevivência, como o órgão, que não é normalmente afetado pelo vírus *in vivo*; e as células renais depois de dissociadas e cultivadas *in vitro* perderiam sua avançada diferenciação e polarização tornando-se mais do tipo epitelial de revestimento. Aliás, talvez seja interessante notar que, quando se preparam os fragmentos de tecido renal, estes são tão fortemente ácidos, que viram rapidamente a cor do vermelho fenol contido nas soluções de lavagem; muito provavelmente esta seria uma

TABELA I
CULTURAS DE RIM DE VITÊLO

1. ^a Inoculação	Vírus "C"	Vírus "C"	Vírus "O"	Vírus "O"	—
2. ^a Inoculação	—	Vírus "A"	—	Vírus "A"	Vírus "A"
Efeito citopático (18 hs.)	parcial	negativo	parcial	negativo	total

CULTURAS DE RIM DE LEITÃO

1. ^a Inoc.	"A" + soro + "A"	"A" + soro + "A"	—	"C" + soro + "C"	—	"A" + soro + "C"	"C" + soro + "A"	"A" morto	"A" morto	"A" morto
2. ^a Inoc.	—	"C"	"C"	—	"A"	—	—	—	"A" (ativo)	"C"
Ef. Cit. (18 hs.)	negat.	negat.	total	negat.	negat.	total	total	negat.	total	total

TABELA II
VACINA MONOVALENTE "C"

ANIMAIS (Bezerros de 7-8 meses)	7-4-58	22-4-58	24-4-58		29-4-58	
			Temp. (°C)	Lesão primária	Temp. (°C)	Lesões secundárias
LOTE A	1	8 ml de vacina "C"	39,2	Lingua	39,4	negativas
	2		39,2	"	39,9	"
	3		38,6	"	35,4	"
	4		38,8	"	38,5	"
	5		39,2	"	38,8	"
LOTE B	6	0,4 ml VIRUS "C" [400.000 de DL 50%]	39,5	"	39,0	4 patas
	7		39,2	"	39,0	"
	8		40,5	"	39,5	"
	9		39,2	"	38,5	"
	10		40,2	"	40,00	"

TABELA III
COMPARAÇÃO DE TÍTULOS

VÍRUS	Passagem e data	Diluição do inóculo inicial	Diluição usada	Títulos camundongo (log. DL50/ml)	Cultura (log. TCID 50/ml)	EFEITO CITOPÁTICO	
						células bovinas	células suínas
(1) C	12. ^a (15-1-58)	10-25	puro	5,97	6,67	parcial	total
(1) C	14. ^a (11-4-58)	10-28	1:10	5,80	7,00	"	"
(1) C	15. ^a (2-5-58)	10-29	1:10	6,90	7,67	"	"
(2) C	Bov. (7-3-58)	10-25	1:100	6,97	6,50	—	—
(3) C	7. ^a (30-7-58)	10-12	puro	8,16	7,50	parcial	total
(3) C	8. ^a (11-8-58)	10-14	1:10	6,92	7,50	"	"
A	4. ^a (4-7-58)	10-4	puro	6,80	7,00	total	"
A	6. ^a (30-7-58)	10-8	1:10	6,67	7,66	"	"
A	7. ^a (11-8-58)	10-9	puro	6,80	8,00	"	"
O	3. ^a (4-7-58)	10-3	"	7,50	7,30	parcial	"

(1) Vírus "C" cultivado em cultura de rim de vitelo desde 23-4-57.

(2) Vírus "C" da 12.^a passagem (15-1-58) inoculado em língua de bezerro.

(3) Vírus "C" nova série de passagens a partir da 4.^a passagem da primeira série, conservado a 30° C desde 26-4-57.

TABELA IV
IDADE DAS CULTURAS

CULTURAS	INÓCULO	PASSAGEM	MEIO	TÍTULO EM CAMUNDONGO (log. DL 50/ml)
12 dias	1:10	15. ^a	(1) HL — Cav.	6,3
22 "	1:10	15. ^a	HL — Cav.	4,9
22 "	1:10	15. ^a	(2) HL-tris-cav.	6,97
34 "	1:10	15. ^a	HL — Cav.	4,6

(1) Hidrolisado de lactalbumina 0,5 por cento com 2% de sêro de cavalo.

(2) O mesmo meio com adição de tris(hidroximetilaminometano).

TABELA V
VOLUME DE MEIO DE CULTURA

CULTURAS	INÓCULO	PASSAGEM	MEIO	TÍTULO EM CAMUNDONGO (log. DL 50/ml)
11 dias	1:10	14. ^a	HL-cav. 100 ml	6,5
11 "	1:10	14. ^a	HL-cav. 50 ml	6,97
13 "	1:10	14. ^a	HL-cav. 50 ml	5,8
13 " (*)	1:10	14. ^a	HL-cav. 20 ml	6,9

(*) Células de uma garrafa de Roux (aproximadamente 200 milhões) em suspensão em 20 ml de meio de cultura.

TABELA VI
CONSERVAÇÃO DO VIRUS CONGELADO

PASSAGENS	DATA	CULTURAS	TÍTULO EM CAMUNDONGO (log DL 50/ml)			
12. ^a	15-1-58	11 dias	20-1-58	5,97	4-3-58	4,97
13. ^a	24-3-58	10 "	11-4-58	6,50	16-6-58	6,05
14. ^a a	25-3-58	11 "	29-3-58	7,63	21-5-58	6,97
14. ^a b	25-3-58	11 "	29-3-58	6,9	21-5-58	6,8
15. ^a	2-5-58	22 "	9-6-58	4,3	15-7-58	4,6
15. ^a	2-5-58	34 "	16-6-58	4,6	15-7-58	4,6

das causas que levariam a uma tão rápida inativação do vírus que tornaram negativas as tentativas de Koefoed.

O vírus foi cultivado ainda em tecido pulmonar e cardíaco de embrião bovino (38). Seria interessante se saber, no caso das culturas de tecido cardíaco, quais as células afetadas pelo vírus, tendo-se em vista que em animais jovens a infecção pelo vírus causa lesões miocárdicas.

Citopatogenicidade — Numa cultura de rim suíno parece existir, do ponto de vista de sensibilidade ao vírus, um único tipo de células. Estas, talvez, por apresentarem pequena capacidade de síntese de metabolitos essenciais, também essenciais à multiplicação do vírus, sofreriam um verdadeiro parasitismo por parte deste, que as conduziria à morte. Por outro lado, numa cultura de rim bovino, parecem existir pelo menos dois tipos. Um constituído de células fisiologicamente semelhante às de rim de leitão, isto é, que, frente ao vírus, apresentam alterações patológicas que as conduzem à morte, outro, de células que suportam a multiplicação do vírus no seu interior sem apresentarem alterações patológicas aparentes. O vírus, nestas células, se comportaria mais como comensal do que como parasita, isto é, parece não interferir nos sistemas metabólicos essenciais, ou então, estas células seriam dotadas de tal capacidade de síntese, que a presença do vírus não lhes causaria dano apreciável. Por isso, adotamos, com SELLERS (56) e PAY (46) as culturas de rim suíno para titulação e tipificação do vírus, pois, neste sistema de cultura é de se esperar que toda partícula infectante, uma vez adsorvida, seria evidenciável pelo efeito citopático específico causado (53); ao passo que, em culturas de rim de vitelo, muitas partículas seriam também adsorvidas pelas células insensíveis e o título do vírus seria, por esta razão, falseado. Assim, PETERMANN (48) verificou que o título obtido por contagem de placas em cultura de rim de vitelo é sempre inferior ao obtido por inoculação em camundongo. No entanto, tanto no presente trabalho como no de MACKOWIAK *et al* (34), nos quais se fizeram titulações paralelas em culturas de rim suíno e em camundongo, obteve-se estreito paralelismo de resultados e mesmo, em geral, os títulos obtidos em cultura são um pouco mais altos, indicando maior sensibilidade deste sistema.

O recente trabalho de DINTER (7) que demonstra a variação da capacidade citopatogênica de vinte amostras diferentes de vírus dos três tipos, em cultura de tecido renal bovino, parece, no entanto, abalar a hipótese de que a diferença de extensão do efeito citopático, neste sistema de cultura, dependa exclusivamente da existência dos dois tipos de células acima referidos: parece haver também diferença

de capacidade agressora entre as partículas infectantes. Porém, como a citopatogênese tem sido demonstrado depender de muitas variáveis, como composição do meio nutritivo, pH, técnica usada para a preparação das culturas (45, 57, 61), que se refletem no estado fisiológico das células, achamos que, no momento, não podemos discutir seus resultados. Isto só poderia ser feito quando se empregasse série de culturas em réplicas, resultantes da multiplicação de um único tipo de células por isolamento de colônias.

Mas, outro fato poderia ser usado como argumento: o vírus aftoso tipo "A" tem capacidade de causar alterações patológicas nos dois possíveis tipos de células de uma cultura de rim bovino, isto é, estes dois tipos de células só são evidenciáveis quando frente ao vírus "O" e "C". Poder-se-ia pensar em maior velocidade de reprodução do vírus "A", que acarretasse a desorganização rápida e irreversível pelo esgotamento das reservas celulares. Mas, se assim fôsse, muito provavelmente este fato seria evidenciável por um efeito citopatogênico mais precoce quando frente a "A" do que frente a "O" e "C", o que não se dá. Esta questão só seria respondida a contento, quando se estudasse a fisiologia comparada da célula normal e parasitada nos vários estágios anteriores à condição patológica evidenciável morfológicamente, porque muito antes da célula sensível se degenerar, ela já libera vírus sintetizado no seu interior (2, 5).

Por enquanto, baseados em nossa experiência e na de outros autores (22, 23, 34, 36, 56, 57) achamos que o mais indicado sistema para titulação e tipificação seguras e precisas é o constituído pelas células renais suínas, contanto que a técnica seja rigorosamente padronizada.

Interferência — O fato das culturas de rim bovino, uma vez tratadas pelos tipos de vírus aftoso "O" e "C", que não destroem tôdas as células da cultura, quando posteriormente lavadas e inoculadas com o tipo "A" em dose suficiente para produzir em 18 horas a destruição das culturas testemunhas, não sofrerem efeito citopático, leva a crêr que se trata aqui de interferência entre tipos. Isto confirma a idéia do esbanjamento de partículas infectantes, pela sua adsorção por células não sensíveis, quando se pratica titulação em culturas bovinas. Fato semelhante observou DINTER (7) entre partículas do mesmo tipo.

Como as culturas suínas são sempre sensíveis aos três tipos de vírus, pudemos demonstrar que mesmo o complexo vírus-soro imune é capaz de ocupar na célula o lugar do vírus, de modo a impedir, como foi observado, que ela sofra alteração patológica quando tratada por outro tipo de vírus ativo, em concentração tal capaz de

promover, em 18 horas, a completa destruição das culturas testemunhas. Não obtivemos bloqueamento da célula por vírus morto pelo calor, mas talvez o processo para inativar o vírus tenha sido muito drástico e tenha resultado em desnaturação das proteínas do vírus.

Cultura em massa e provas preliminares de vacinação — Adotamos, para obtenção do vírus aftoso, as culturas de rim de vitelo, principalmente por se tratar de tecido homólogo, tendo-se em vista que a maior solicitação de vacina anti-aftosa é para gado bovino. É verdade que, em trabalhos recentes (36, 37) foi demonstrada a possibilidade de preparo de vacina com vírus cultivado em tecido suíno.

Depois de 12 passagens em cultura, o vírus tipo "C" se mostrou infectante para bezerros e a vacina preparada com este vírus conferiu 100 por cento de proteção contra generalização da infecção pelo mesmo vírus. Observamos aqui o critério de proteção adotado por HENDERSON & GALLOWAY (29), isto é, mesmo que aftas primárias se desenvolvam nos pontos de inoculação, uma proteção completa contra o desenvolvimento de lesões secundárias, corresponde a completa proteção contra a infecção por contacto com gado aftoso.

Os resultados preliminares de vacinação nos animaram a preparar uma vacina trivalente que está sendo experimentada.

CONCLUSÕES GERAIS

A cultura do vírus aftoso pelas técnicas modernas de cultura de tecidos abre um campo vasto de pesquisas que interessa tanto do ponto de vista teórico como do ponto de vista prático. Neste último já apresenta resultados muito promissores (8, 37) e seria de toda vantagem juntarmos nossos esforços com o fim de se obter uma vacina eficiente e barata num país como o nosso que se apoia em grande parte nos seus rebanhos.

MULTIPLICATION AND CYTOPATHOGENIC EFFECT OF THE FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS IN KIDNEY TISSUE CULTURE

Abstract

1 — *The swine kidney cells "in vitro" show cytopathogenic effect for the three types of the foot-and-mouth disease virus: A, O, C. The destruction of the cultures is complete in 36 hours. This cytopathogenicity is always absent in the cultures treated by the proper dilutions of virus and specific immune sera.*

2 — The bovine kidney cells "in vitro" show a different behavior: when infected with "A" type, they seem to behave like the swine ones; when treated with "O" and "C" types it seems that there are two cell types physiologically distinct — both supporting virus multiplication, but only one being affected by the virus; in other words, in one cell type the virus could be classified as a comensal and in the other as a true parasite.

3 — It was possible to demonstrate interference between the virus types treated or not treated by the specific immune sera in swine as well as bovine kidney cultures (see table I).

4 — Preliminary experiments on vaccination of cattle with a vaccine prepared with a 12th passage of type "C" virus in bovine kidney monolayer gave good results: a protection of 100 per cent of the vaccinated animals against generalization of the infection, although primary lesions developed at the sites of inoculation of the challenge virus (see table II).

5 — Usually, titles obtained by titration in swine cultures are very similar with those obtained by inoculation in mice, but somewhat higher (see table III).

6 — Generally, the higher titles were obtained when the viruses were cultivated in tissue cultures not older than 15 days. The use of tris(hydroxymethylaminomethane), as buffer, improved the titles in older cultures (see Table IV) probably by preventing virus inactivation by pH decrease. The presence of this substance in the virus suspensions did not interfere with the complement fixation tests.

7 — We have not succeeded in the attempts to obtain more concentrated virus population by the use of lesser quantities of culture media (see Table V).

8 — The titles before and after the virus preservation at —30° C for one or two months, without addition of any preservative substances, were maintained practically the same (see table VI).

BIBLIOGRAFIA

- 1 — BACHRACH, H. L.; HESS, W. R. & CALLIS, J. J. — 1955 — Foot-and-mouth disease virus: its growth and cytopathogenicity in tissue culture. *Science*, 122 (3183): 1269-70.
- 2 — BACHRACH, H. L.; CALLIS, J. J.; HESS, W. R. & PATTY, F. E. — 1957 — A plaque assay for foot-and-mouth disease virus and kinetics of virus reproduction. *Virology*, 4: 224-36.

- 3 — BODIAN, D. — 1956 — Simplified method of dispersion of monkey kidney cells with trypsin. *Viol.* 2: 575-6.
- 4 — BRAGA, A. — 1939 — Notas cyto-biologicas — Contribuição á technica de histo-cultura e virus-cultura. *Bol. Inst. Vital Brazil* 22: 5-34.
- 5 — CARTWRIGHT, S.; PAY, T. W. F. & HENDERSON, W. M. — 1957 — Multiplication of the virus of foot-and-mouth disease in culture. *J. Gen. Microbiol.* 16 (3): 730-48.
- 6 — CASTRO, M. P. DE & MELLO, D. — 1957 — Tecido renal de cobáia cultivado por nova técnica e sua sensibilidade ao vírus da febre aftosa. *Arq. Inst. Biol.* 24 (12): 163-7.
- 7 — DINTER, Z. — 1958 — Interferenz zwischen cytopathogenen und nicht cytopathogenen Partikeln des Virus der Maul-und-Klauenseuche. (MKS). *Arch. ges. Virusforsch.* 8 (1): 42-50.
- 8 — DINTER, Z. & WESSLÉN, T. — 1958 — Etude sur la production et le contrôle du vaccin anti-aphteux préparé selon la technique des cultures de tissus. *Bull. Off. Internat. Epiz.* 49 (1-2): 87-90.
- 9 — DULBECCO, R. — 1952 — Production of plaques in monolayer tissue culture by single particles of an animal virus. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 38 (8): 747-52.
- 10 — DULBECCO, R. & VOLT, M. — 1954 — Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J. Exp. Med.* 99 (2): 167-82.
- 11 — ENDERS, J. F.; WELLER, T. H. & ROBBINS, F. C. — 1949 — Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissues. *Science*, 109: 85-7.
- 12 — FOGEDBY, M. E. F. & MICHELSEN, E. — 1947 — La culture du virus aphteux et l'utilisation du virus de culture. *Bull. Off. Internat. Epiz.* 27: 201-20.
- 13 — FRENKEL, H. S. — 1947 — La culture du virus de la fièvre aphteuse sur l'épithélium de la langue des bovidés. *Bull. Off. Internat. Epiz.* 28: 155.
- 14 — IDEM — 1949 — Histologic changes in explanted bovine epithelial tongue tissue infected with the virus of foot-and-mouth disease. *Amer. J. Vet. Res.* 10 (35): 142-5.
- 15 — IDEM — 1950 — Research on foot-and-mouth disease. II — The cultivation of the virus in explantations of tongue epithelium of bovine animals. *Ibidem* 11 (41): 371-3.
- 16 — IDEM — 1951 — Research on foot-and-mouth disease. III — The cultivation of the virus on a practical scale in explantations of bovine tongue epithelium. *Ibidem* 12 (44): 187.
- 17 — IDEM — 1953 — Recherches sur la fièvre aphteuse. Emploi d'épithélium lingual bovin importé de pays indemnés du virus de la fièvre aphteuse pour la culture *in vitro* de ce virus sur une échelle pratique. *Bull. Off. Internat. Epiz.* 39: 131.
- 18 — IDEM — 1954 — Research on foot-and-mouth disease. VII — Cultivation of the virus on a practical scale in explantation of tongue

- epithelium. A modification of the culture technique. *Amer. J. Vet. Res.* 15 (56): 346-8.
- 19 — FRENKEL, H. S. & DUNNE, H. W. — 1952 — Research on foot-and-mouth disease virus in explanted epithelium of the bovine tongue. IV Tissue and medium variations. *Ibidem* 13: 21-3.
- 20 — FRENKEL, H. S. & RIBELINI, W. E. — 1956 — Cultivation of the foot-and-mouth disease virus in explanted epithelium of the bovine tongue. IX — Growth characteristics of the virus in large scale tissue culture. *Ibidem* 17 (62): 40-4.
- 21 — FRENKEL, H. S. & WAVEREN, G. M. — 1935 — Sur la culture de l'agent de la fièvre aphteuse "in vitro". Resumo in: *Bull. Off. Internat. Epiz.* 9: 807-8.
- 22 — GUILLOT, P. — 1957 — Culture du virus de la fièvre aphteuse (Type O) en cultures de tissus de reins de porc. II — Etude de l'infectivité. *Ann. Inst. Pasteur*, 93 (1): 81-90.
- 23 — IDEM. — 1958 — Culture du virus de la fièvre aphteuse (Type O) en cultures de tissus de reins de porc. II — Etude au microscope électronique de l'évolution des cellules infectées. *Ibidem*, 94 (5): 571-6.
- 24 — HANKS, J. H. & WALLACE, R. E. — 1949 — Relation of Oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration. *Proc. Soc. Exper. Biol.* 71: 196.
- 25 — HECKE, F. — 1930 — Zuchtungsversuche des Maul-und-Klauenseuchevirus in Gewebekulturen. *Zbl. Bakt. (Orig.)* 116: 386-414.
- 26 — HECKE, F. — 1931 — Weitere Mitteilungen über die künstliche Vermehrung des Maul-und-Klauenseuchevirus in Gewebekulturen. *Ibidem* 119: 385-97.
- 27 — HENDERSON, W. M. in: SANDERS, F. K. — 1953 — Possible multiplications cycles in neurotropic viruses. 2.^o *Symposium of the Soc. Gen. Microbiol.* (Oxford University) — Abril de 1952; p. 217.
- 28 — HENDERSON, W. M. — 1953 — The use of virus culture in foot-and-mouth disease research. *Proc. XVth Internat. Vet. Congress* (Stockholm); 3-8.
- 29 — HENDERSON, W. M. & GALLOWAY, I. A. — 1953 — The use of culture virus in the preparation of foot-and-mouth disease vaccine. *J. Hyg.* 51: 546-58.
- 30 — HIRTZ, J. & FAYET, M. T. — 1955 — Recherches sur la multiplication du virus aphteux en culture de tissu. II — Etude biochimique des cultures de longue durée. *Rev. Immunol.* 19: 436-46.
- 31 — KÖBE, K. & FERTIG, H. — 1936 — Die Züchtung des Maul-und-Klauenseuchevirus in Reinkulturen von Epithelzellen und Fibroblasten. *Zbl. Bakt. (Orig.)*, 138: 14-20.
- 32 — KOEFOED — 1942 — Maanedsskr. Dyrloeg 54, *Apud*: FOGEDBY & MICHELSEN (12).
- 33 — MACKOWIAK, C.; GIRARD, H.; CAMAND, R. & HIRTZ, J. — 1955 — Recherches sur la multiplication du virus aphteux en culture de tissu. I — Etude biologique des cultures de longue durée. *Rev. Immunol.* 19: 426-35.

- 34 — MACKOWIAK, C. & LANG, R. — 1958 — Emploi des cultures de tissu dans le titrage du virus aphteux et la recherche des anticorps. *Bull. Off. Internat. Epiz.* 49 (1-2): 99-105.
- 35 — MAITLAND, M. C. & MAITLAND, H. B. — 1931 — Cultivation of foot-and-mouth disease virus. *J. Comp. Path.* 44: 106-13.
- 36 — MAZZARACHIO, V.; D'AMORE, A.; ORFEI, Z. — 1956 — Il virus aftoso sur coltura di tessuto "in vitro". II — Curva di crescita "in vitro" ed "in vivo" dei tipi A, O, C. *Atti Soc. Ital. Sci. Vet.* 10: 575-9. Resumo: *Bull. Inst. Pasteur* 56 (4): 1246 (1958).
- 37 — MAZZARACHIO, V.; ZAVAGLI, V.; ORFEI, Z.; D'AMORE, A.; RAVAIOLI, L. & CASTAGNOLI, B. — 1958 — Nouveau vaccin anti-aphteux — préparé avec des virus de culture sur reins de porc. *Bull. Off. Internat. Epiz.* 49 (1-2): 91-2.
- 38 — MELENDEZ, L.; GAGGERO, A.; RODRIGUES, R. & NORAMBUENA, G. — 1957 — Multiplication of foot-and-mouth disease virus in adult kidney, embryonic lung and heart bovine tissue cultures. *Proc. Soc. Exper. Biol.* 95 (4): 696-7.
- 39 — MELNICK, J. L.; RAPPAPORT, C.; BANKER, D. D.; & BHATT, P. N. — 1955 — Stabilized suspensions of monkey kidney cells suitable for intercontinental shipment. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 88 (4): 676-8.
- 40 — MELNICK, J. L.; & RIORDAN, J. T. — 1952 — Poliomyelitis virus in tissue Culture. IV — Protein free nutrient media in stationary and roller tube cultures. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 81: 208-13.
- 41 — MOSCONA, A. — 1952 — Cell suspensions from organs rendiments of chick embryos. *Exper. Cell Res.* 3 (3): 535-9.
- 42 — NARDELI, L. — 1956 — Ergebnisse und Probleme bei der Züchtung des Maul-und-Klauenseuchevirus in der Gewebekultur. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 69 (16): 309-11.
- 43 — PALMA, E. E. & EFSTEIN, B. — 1951 — Observaciones histológicas sobre cultivos de tejidos en piel de fetos de bovinos con virus de la fiebre aftosa. *Rev. Med. Vet., Montevideo*, 26 (51): 1244-9.
- 44 — PAY, T. W. F. — 1956 — Growth of bovine amniotic ectoderm as a cell monolayer on glass and its use as a system for virus multiplication. *Nature* 177 (4512): 752-3.
- 45 — IDEM — 1957 — The propagation of the foot-and-mouth disease virus in monolayer cultures of adult bovine tongue epithellum. *Proc. Roy. Soc. Med.* 50: 919-22.
- 46 — IDEM — 1957 — The uses of tissue culture methods in foot-and-mouth disease research. *Vet. Rec.* 69 (52): 1449-51.
- 47 — PERRY, V. O.; EVANS, V. J.; EARLE, W. R.; HYATT, G. W.; BEDELL, W. C. — 1956 — Long term tissue culture of human skin. *Amer. J. Hyg.* 63 (91): 52-58.
- 48 — PETERMANN, H. G.; LANG, R. & MACKOWIAK — 1956 — Propagation du virus de la fièvre aphteuse en culture de tissu. *C. R. Acad. Sci.* 243 (14): 991-3.

- 49 — RAPPAPORT, C. — 1956 — Monolayer culture of trypsinized monkey kidney cells in synthetic medium. Applications to poliovirus synthesis. *Proc. Soc. Exper. Biol.* 91 (3): 464-70.
- 50 — REED, L. T. & MÜNCH, H. — 1938 — A simple method of estimating fifty per cent end points. *Amer. J. Hyg.* 27: 493.
- 51 — RINALDINI, L. M. — 1954 — A quantitative method for growing animal cells "in vitro". *Nature* 173 (4415): 1134-5.
- 52 — IDEM — 1954 — A quantitative method of cell culture. Proceedings of the Physiological Society 18-19 December 1953. *J. Physiol.* 123 (2).
- 53 — ROBIN, F. C.; WELLER, T. H. & ENDERS, J. F. — 1950 — Cytopathogenic effect of poliomyelitis viruses "in vitro" on human embryonic tissues. *Proc. Soc. Exper. Biol.* 75: 370-4.
- 54 — ROSENBUCH, C. T. — 1953 — Multiplication del virus aftoso en cultivo de tejidos para elaboration de vacuna. *Gac. Vet.*, Buenos Aires, 15: 99-100.
- 55 — ROUS, P. & JONES, F. S. — 1916 — A method for obtaining suspensions of living cells from the fixed tissues and for the plating out of individual cells. *J. Exper. Med.* 23: 549-55.
- 56 — SELLERS, R. F. — 1955 — Growth and titration of the viruses of foot-and-mouth disease and vesicular stomatitis in kidney monolayer tissue. *Nature* 176 (4481): 547-9.
- 57 — IDEM — 1957 — Some observations on the plaque technique. In: Recent advances in the use of tissue culture methods in virus research. *Proc. Roy. Soc. Med.* 50 (10): 915-9.
- 58 — SWIM, H. E. & PARKER, R. F. — 1955 — Nonbicarbonate buffers in cell culture media. *Science*, 122 (3167): 466.
- 59 — UBERTINI, B.; NARDELLI, L.; BAREÍ, S. & SANTERO, G. — 1955 — Observations et études sur le virus de la fièvre aphteuse cultivé in vitro" suivant la methode de Frenkel. *Bull. Off. Internat. Epiz.* 43: 559-74.
- 60 — WALDMANN, O. — 1938 — Die aktive Immunisierung gegen Maul-und-Klauenseuche. *Berl. Münch Tierärztl. Wschr.* 45: 685-8.
- 61 — WESSLÉN, T. & DINTER, Z. — 1956 — The cultivation and titration of the foot-and-mouth disease virus in cultures of different bovine tissues. *Nord. Vet. Med.* 8: 795-806, *apud*: SELLERS (57).
- 62 — WILLEM, R. & LEUNEN, J. — 1956 — Application de la méthode de culture du virus aphteux selon H. Frenkel. Résultats obtenus au laboratoire de Recherches Vétérinaires de l'Etat, Uccle — Bruxelles. *Bull. Off. Internat. Epiz.* 45 (34): 298-308.
- 63 — YOUNGNER, J. S. — 1954 — Monolayer tissue cultures. I — Preparation and standardization of suspensions of trypsin-dispersed monkey kidney cells. *Proc. Soc. Exper. Biol.* 85 (2): 202-5.
- 64 — YOUNGNER, J. S. — 1955 — Demonstration of neutralizing antibodies for poliomyelitis virus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 61 (4): 774-80.

ATIVIDADE ANTITUMORÍGENA DOS LÍQUIDOS DE CULTURA
DO FUNGO "*BEAUVERIA BASSIANA*" DEMONSTRADA "IN
VITRO" SÔBRE O ADENOCARCINOMA TRANSPLANTÁVEL
DO CAMUNDONGO (*)

POR

J. R. Meyer

Do Instituto Biológico de São Paulo

Com as estampas 5 e 6

Em trabalhos anteriores (1, 2, 3 e 4) tivemos a oportunidade de demonstrar que extratos ou líquidos de cultura de diversos cogumelos produzem substâncias que destroem a capacidade tumorigêna de fragmentos de tumores transplantáveis de camundongos, quando deixados em contato com elas durante algum tempo.

Tendo-nos sido oferecida uma cultura de *Beauveria bassiana* pelo nosso distinto companheiro o Eng^o Agr. Drummond Gonçalves, com a informação de que essa cepa, isolada do bicho da sêda, era dotada de grande poder patogênico não só para as larvas do bicho da sêda, mas, também, sobre gafanhotos adultos, quisemos verificar se êsse fungo também produzia substâncias com a propriedade anti-tumorigêna citada.

Para isso foi feita, com essa amostra, uma cultura sôbre líquido Czapek-Dox modificado (5). Sendo bastante rápido o desenvolvimento do fungo nesse meio, ao cabo de 10 dias foi retirada uma pequena parte do líquido de cultura que, nessa ocasião, já apresentava uma côr amarela pálida e um pH igual a 7. Essa amostra foi usada para o seguinte ensaio preliminar:

ENSÁIO PRÉVIO: No líquido colhido foram colocados diversos pedaços de um adenocarcinoma transplantável do camundongo. O mesmo tumor forneceu diversos pedaços que foram postos em contato com solução salina isotônica. O contato dos fragmentos de tumor com êsses líquidos durou cêrca de 48 horas, numa temperatura de cêrca de 4° C.

Com êsse tratamento os pedaços colocados no líquido de cultura se tornaram pálidos e de aspecto macerado. Os fragmentos colocados em solução salina isotônica conservaram a côr e o aspecto do tecido fresco. Ambos os grupos de fragmentos foram, então, inoculados, separadamente, sob a pele de dois grupos de camundongos machos e novos. Ao fim de 2 semanas, 100% dos camundongos testemunhas, que tinham recebido os fragmentos de tumor postos em solução salina, apresentavam tumores em franco crescimento e os camundongos inoculados com os fragmentos tratados pelo líquido de cultura não apresentavam nenhum tumor.

(*) Recebido para publicação, em 15 de setembro de 1958.

Essa mesma experiência foi repetida mais 3 vezes, fornecendo resultados praticamente idênticos. Apenas na inoculação 4, como mostra o quadro seguinte, desenvolveu-se um tumor. Este tumor se caracterizou por seu tamanho pequeno e por um desenvolvimento muito lento.

QUADRO RESUMINDO AS EXPERIÊNCIAS DE INOCULAÇÃO DOS PEDAÇOS DE TUMOR TRATADOS PELO LÍQUIDO DE CULTURA DE *B. BASSIANA*

ENSAIO N.º	INOCULAÇÕES		N.º de tumores resultantes das inoculações		Porcentagens de resultados positivos	
	Com fragmentos de tumores tratados por líquido de cultura	Com fragmentos de tumores tratados pela solução salina.	com tumores tratados	testemunhas	com pedaços de tumores tratados	com pedaços de tumores testemunhas
1	5	5	0	5	0%	100%
2	5	5	0	5	0%	100%
3	5	5	0	5	0%	100%
4	5	5	1	5	20%	100%
TOTAIS	20	20	1	20	5%	100%

Pelos resultados registrados no quadro anterior vê-se que num total de 20 camundongos que receberam fragmentos de tumor tratados pelo líquido de cultura *B. bassiana*, só se desenvolveu um único tumor, ao passo que nos 20 camundongos testemunhas, que receberam fragmentos postos em contato com solução salina, houve desenvolvimento de 20 tumores. Esses números nos dão uma diferença de percentagens de positividade bastante grande, a saber, de 5% para o material tratado, contra 100% para o material não tratado.

DISCUSSÃO

O único tumor que se observou na experiência de n.º 4 deve-se, possivelmente, ao fato de o líquido de cultura não ter penetrado em todo o tecido. É possível, também, que com os 10 dias de cultura, a quantidade de substância antitumorigena não fôsse suficiente para atacar tôdas as células tumorais. Esse mesmo líquido, usado com 60 dias de cultura, mostrou uma atividade de 100%.

Os efeitos observados nas quatro experiências não devem ser atribuídos à influência do pH, por isso que em experiências anteriores já havíamos verificado que a atividade tumorigênica dos pedaços de tumor não é destruída, mesmo quando esses pedaços são submetidos à ação de soluções salinas tendo um pH variável entre 5 e 7,5. No decurso do crescimento dessas culturas o pH sofre uma elevação de 6 a 7,3 ficando, portanto, dentro dos limites compatíveis com a atividade tumorigênica do tecido. Convém lembrar que numerosos ensaios feitos anteriormente, já haviam mostrado que o líquido de cultura onde não houver crescimento de cogumelo é completamente inócuo, não exercendo efeito sobre a atividade tumorigênica do material.

Os ensaios feitos com o líquido de cultura "in vivo" sobre os camundongos portadores de tumor não puderam ser observados, porquanto esse líquido tem uma certa toxicidade também para esses animais.

Os camundongos de 20 gramas não podem receber mais que 1,5 cc desse líquido, no decorrer do tratamento.

Com os resultados registrados, mais uma vez se demonstra que diversos cogumelos inferiores são dotados da capacidade de produzir, durante o seu crescimento, e de cederem ao líquido de cultura empregado, princípios ativos que têm a propriedade de inativar os fragmentos do adenocarcinoma transplantável do camundongo.

RESUMO

O autor descreve uma série de experiências demonstrando que o fungo *Beauveria bassiana*, quando cultivado sobre líquido de Czapek-Dox modificado, elabora um princípio que "in vitro" destrói a atividade tumorigênica do adenocarcinoma transplantável do camundongo.

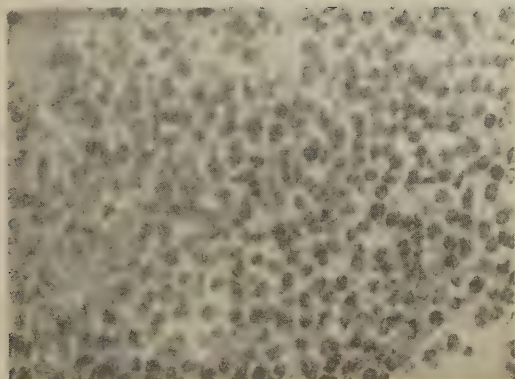
ANTINEOPLASTIC ACTIVITY OF A CULTURE MEDIUM WHERE THE FUNGUS "*BEAUVERIA BASSIANA*" HAD GROWN, AGAINST A TRANSPLANTABLE ADENOCARCINOMA OF THE MOUSE.

A b s t r a c t

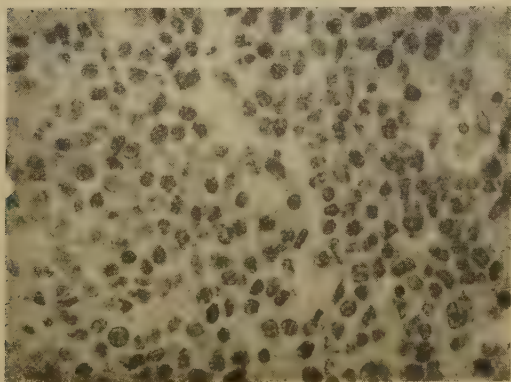
The author refers to a series of experiments showing that the fungus *Beauveria bassiana*, when cultivated on the surface of Czapek-Dox medium slightly modified, produces substances which "in-vitro" destroy the neoplastic activity of tumor tissue from a transplantable adenocarcinoma of the mouse, maintained in our laboratory since 1943.

BIBLIOGRAFIA

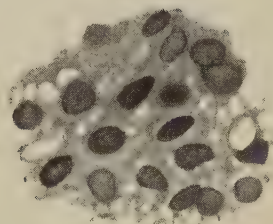
- 1 — MEYER, J. R. — 1946 — Tentativas para separação da substância antineoplásica que se forma nos líquidos de cultura de "*Penicillium notatum*". *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 17: 163-173.
- 2 — MEYER, J. R. & CERRUTI, H. — 1946 — Ação antineoplásica dos extratos aquosos do "*Polyporus cinnabarinus*" demonstrada "in vitro" com um tumor transplantável do camundongo. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 17: 175-181.
- 3 — MEYER, J. R. — 1957 — Ação antineoplásica dos filtrados de cultura de "*Aspergillus flavus*", Link, demonstrada "in vitro" sobre um tumor transplantável do camundongo. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 18: 239-242.
- 4 — MEYER, J. R. — 1951 — Atividade antineoplásica do líquido de cultura de um cogumelo do gênero *Pestalozzia*, demonstrada "in vitro" sobre um tumor transplantável do camundongo. *Arq. Inst. Biol.*, 20: 183-192.
- 5 — MEYER, J. R. — 1945 — Indícios de existência de uma substância antineoplásica formada nos líquidos de cultura de "*Penicillium notatum*". *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 16: 307-314.



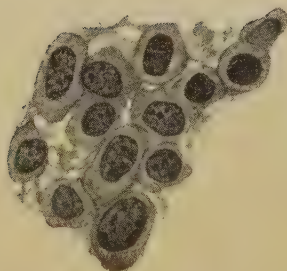
Microfotografia de pedaço do tumor transplantável do camundongo pôsto, durante 48 horas, em líquido de cultura de *Beauveria bassiana* (com 32 dias de desenvolvimento), em temperatura de 4° C. Notar a picnose nuclear e destruição do citoplasma. O material nestas condições, não reproduz o tumor, quando inoculado.



Microfotografia de pedaço de tumor transplantável de camundongo pôsto em solução salina e deixado, em temperatura de 4° C, durante 48 horas. Notar a conservação da cromatina e do citoplasma. O material com êste aspecto, ao ser inoculado, reproduz o tumor.



Desenho mostrando o aspecto das células tumorais após contato de 72 horas, à temperatura de 4° C, com o líquido de cultura da *Beauveria bassiana*. Notar a picnose dos núcleos e a vacuolização do citoplasma.



Desenho mostrando o aspecto das células do mesmo tumor após contato de 72 horas, à temperatura de 4° C, com solução salina. Notar a conservação das estruturas cromáticas dos núcleos e a conservação do protoplasma.

POSSIBILIDADE DE IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS CONTRA
A INOCULAÇÃO DO ADENOCARCINOMA TRANSPLANTÁVEL
PELO EMPREGO DE MATERIAL TRATADO PELO LÍQUIDO DE
CULTURA DE *BEAUVERIA BASSIANA* (*)

POR

J. R. Meyer

Do Instituto Biológico de São Paulo

Em observações anteriores (1) verificamos que os pedaços do adenocarcinoma transplantável do camundongo, tratados pelos extratos do cogumelo *Polyporus cinnabarinus*, quando inoculados em camundongos, tornavam certo número desses animais resistentes a novas inoculações do mesmo tumor.

Tendo mostrado que os líquidos de cultura de outro cogumelo (*Beauveria bassiana*) (2) também têm a capacidade de inativar os pedaços desse tumor, de modo a torná-los, em sua maioria, incapazes de reproduzir novos tumores, quando inoculados, resolvemos verificar se os pedaços assim tratados ficavam, também, com a propriedade de tornar os camundongos que os recebiam, resistentes a inoculação do tumor.

Com esse propósito em vista realizamos a seguinte experiência:

Exp. N.º 1283 — Dez camundongos novos e normais foram separados em dois lotes de 5 animais. O primeiro lote recebeu pedaços de tumor que durante 28 horas tinham permanecido em contato com um líquido de uma cultura de *Beauveria bassiana*, contando 30 dias de desenvolvimento. Este tratamento foi feito à temperatura de 4º C. Ao mesmo tempo o segundo lote foi inoculado com pedaços do mesmo tumor. Estes últimos pedaços, porém, para servirem como prova da sua atividade tumorigênica, foram deixados apenas em solução salina isotônica, durante o mesmo período de tempo e à mesma temperatura.

Ao fim de 26 dias após as inoculações, não tendo os animais do primeiro lote apresentado nenhum crescimento, receberam de novo outros pedaços de tumor tratados, também, por um líquido idêntico, sem, todavia, que disso resultasse qualquer tumor. Por isso, 26 dias após a segunda inoculação os mesmos camundongos receberam pedaços de um tumor não tratado,

(*) Recebido para publicação em 15 de setembro de 1958.

que também forneceu material para inoculação de 5 camundongos normais. Os resultados foram os seguintes:

Nos 5 camundongos preparados com duas inoculações prévias de tumor tratado pelo líquido de cultura de *B. bassiana* e enxertados com tumor ativo **nenhum tumor se desenvolveu.**

Nos 5 camundongos testemunhas inoculados com pedaços do mesmo tumor que serviu para inocular os camundongos do grupo anterior desenvolveram-se **5 tumores.**

Por êstes resultados se vê que os camundongos se tornaram resistentes à inoculação do material tumoral ativo. Essa mesma experiência foi repetida nas mesmas condições uma segunda vez, dando os seguintes resultados:

Exp. N.º 1285:

Em 5 camundongos previamente inoculados duas vezes com pedaços de tumor inativados pelo líquido de cultura de *B. bassiana* **nenhum tumor.**

Nos 5 camundongos não tratados e inoculados com pedaços do mesmo tumor ativo que serviu para prova do grupo anterior **5 tumores.**

Exp. N.ºs 1286/1287 e 1295 — Nestas experiências foi repetido o que se fez na experiência anterior com um grupo de 7 camundongos que, previamente, haviam recebido fragmentos de tumor tratados por líquido de cultura de *Beauveria* tendo 30, 60 dias e, depois, pedaços de tumor fresco que também foi usado para inocular 5 camundongos, sem nenhum tratamento prévio. Os resultados foram os seguintes:

Nos 7 camundongos previamente inoculados com pedaços de tumor tratados por líquido de cultura *bassiana* e inoculados com tumor fresco **nenhum tumor.**

Nos 5 camundongos testemunhas, que não receberam, previamente, nenhum material de tumor **5 tumores.**

A confirmação dos resultados anteriores leva à conclusão de que os líquidos onde cresceu *B. bassiana*, como acontecia com os extratos de *Polyporus cinnabarinus* (1), têm a capacidade de atuar sobre o tecido do tumor de tal modo que êsse tecido perde a capacidade de reproduzir tumor, mas conserva o poder de agir como antígeno, conferindo, ao organismo dos camundongos que são enxertados com o tecido tumoral tratado, uma imunidade bem nítida contra as novas inoculações do tumor transplantável.

DISCUSSÃO

A capacidade dos tecidos de tumores transplantáveis conferirem uma certa resistência é um fato já estabelecido e registrado na literatura. A resistência até agora conseguida com a utilização de injeções de material tumoral não era grande e esse fato é devido, possivelmente, à falta de um processo que se prestasse à destruição completa das substâncias existentes nos tumores, sem a destruição do antígeno de que o próprio tecido tumoral vivo é portador.

E' sabido que, quando um camundongo já possui um tumor bem desenvolvido, é muito difícil conseguir que uma nova inoculação se desenvolva em outro ponto do animal. Conquanto Ehrlich tenha explicado essa dificuldade por uma questão de concorrência alimentar, o fracasso no desenvolvimento das novas inoculações deve-se, provavelmente, também à existência de anticorpos lançados na circulação pelos tumores grandes preexistentes. Os resultados das experiências referidas neste trabalho oferecem uma evidência em favor desta última hipótese, por isso que, neste caso e em casos semelhantes, não há um tumor preexistente em crescimento, exigindo matéria prima para sua formação. Os anticorpos produzidos pelo material previamente inoculado e que com toda a possibilidade estão presentes, são a causa do não desenvolvimento das inoculações do material fresco enxertado na segunda fase das experiências.



RESUMO

O autor, neste trabalho, descreve a possibilidade de tornar os camundongos resistentes à inoculação do adenocarcinoma transplantável desses animais, mediante inoculações prévias de pedaços do tumor, desde que sejam tratados, previamente, por líquido de cultura do fungo *Beauveria bassiana*.

IMMUNIZATION OF MICE AGAINST A TRANSPLANTABLE
ADENOCARCINOMA BY MEANS OF TUMOR TISSUES TREATED
BY A CULTURE MEDIUM WHERE THE FUNGUS
"BEAUVERIA BASSIANA" HAD GROWN

•
A b s t r a c t

A method is described according to which the resistance of mice against transplantations of the mammary carcinoma is obtained.

*This method consists in the inoculation of small pieces of this tumor previously treated by a fluid medium where the fungus *Beauveria bassiana* was allowed to grow.*

BIBLIOGRAFIA

- 1 — MEYER, J. R. — 1951 — Tentativa de imunização de camundongos contra o adenocarcinoma transplantável. *Arq. Inst. Biol.*, 20: 209-212.
- 2 — MEYER, J. R. — 1958 — Atividade antitumorígena dos líquidos de cultura do fungo *Beauveria bassiana* demonstrada "in vitro" sobre o adenocarcinoma transplantável do camundongo. *Arq. Inst. Biol.*, 25: 59-62.

CARACTERES BIOQUÍMICOS DO *XANTHOMONAS MANIHOTIS* E
X. RUBRISUBALBICANS E SUAS POSIÇÕES NA CHAVE DE
BURKHOLDER (*SCHIZOMYCETES*,
PSEUDOMONADACEAE) *

POR

J. Franco do Amaral
Do Instituto Biológico de S. Paulo

Examinando a chave para identificação das bactérias do gênero *Xanthomonas*, na 7.^a edição do Manual de Bergey (1957), verificamos que *X. manihotis* (ARTHAU BERTHET, 1912), STARR, 1946 e *X. rubrisubalbicans* (CHRISTOPHER et EDGERTON, 1930), SAVULESCU, 1947 não devem permanecer na posição em que foram ali colocadas (pág. 154).

Pelos caracteres bioquímicos de *X. manihotis*, constata-se que para o germe ser posto no item II, foram utilizados resultados extraídos de trabalhos que se contradizem em certas provas, como se pode deduzir do que segue:

BURKHOLDER (13) disse que a bactéria não era capaz de hidrolisar o amido. Esse mesmo resultado negativo com a prova do amido foi obtido por DRUMMOND et HIPÓLITO (20). Ao contrário do que afirmam esses dois autores, demonstramos (1) que, de fato, *X. manihotis* tem a propriedade de hidrolisar o amido. Nossa prova, entretanto, teve que ser aproveitada para que a bactéria pudesse ser colocada no item "1. Starch hydrolized", do grupo dos *Xanthomonas* que possuem colônias "whitish to cream; pigment non-water-soluble". Veja-se também a 6.^a edição do Manual de Bergey, 1948, pág. 170.

Por outro lado, o autor (1), BURKHOLDER (13) e recentemente JARDIM FREIRE (25) provaram que essa bactéria não é capaz de produzir nitritos a partir de nitratos. Aceitando o resultado contrário obtido por DRUMMOND et HIPÓLITO (20), BURKHOLDER acomodou *X. manihotis* no item "a. Nitrites produced from nitrates" (12).

Demonstramos, em trabalho posterior (2), em que realizamos provas comparativas com os três organismos estudados (1, 13, 20), que todas as amostras possuem os mesmos caracteres morfológicos, culturais, bioquímicos e que as provas sorológicas com elas efetuadas

(*) Recebido para publicação em 7 de outubro de 1958.

comprovaram serem idênticas. Os germes das três amostras **hidrolisam o amido e nenhuma delas foi capaz de produzir nitritos a partir de nitratos**.

Nota-se, ainda, que não há, na chave de BURKHOLDER (12: 154) contraste para o item "A. Gelatin liquified". Todavia, há nesse grupo uma espécie que **não liquefaz a gelatina** (vide BURKHOLDER, 12: 176) e que é *X. rubrisubalbicans*.

Essas considerações permitem sugerir as seguintes alterações ao item II (12: 154) da chave para identificação de *Xanthomonas*.

"II. Colonies whitish to cream; pigment non-water-soluble.

A. Gelatin liquified.

1. Starch hydrolized.

a. Nitrites produced from nitrates.

54. *Xanthomonas panici*.

55. *Xanthomonas proteamaculans*.

aa. Nitrites not produced from nitrates.

56. *Xanthomonas manihotis*.

2. Starch not reported.

57. *Xanthomonas cannae*.

58. *Xanthomonas conjac*.

59. *Xanthomonas zingiberi*.

B. Gelatin not liquified.

1. Starch hydrolized.

a. Nitrites not reported.

60. *Xanthomonas rubrisubalbicans*.

Com a modificação proposta à chave dos *Xanthomonas*, acredita-se contribuir para uma padronização dos conhecimentos atuais dos caracteres bioquímicos de *X. manihotis* e dêste modo evitar que os enganos, cometidos com relação à hidrólise do amido e à redução de nitratos, sejam reproduzidos futuramente em outros manuais de bacteriologia.

No caso aqui discutido, ELLIOT (22), desprezando os resultados obtidos pelo autor (1) e baseada nos trabalhos de DRUMMOND et HIPÓLITO (20) e de BURKHOLDER (13), considerou a hidrólise do amido

como negativa para o *X. manihotis*. Contrariando, ainda, a revisão feita por BURKHOLDER para o Manual de Bergey (6.^a edição, pág. 170, 1948 e 7.^a edição, pág. 176, 1957) essa autora dá como negativa a prova de redução de nitratos para esse germe.

BIOCHEMICAL CHARACTERS OF *XANTHOMONAS MANIHOTIS*
AND *X. RUBRISUBALBICANS*; THEIR POSITIONS IN
BURKHOLDER'S 1957 KEY FOR THE GENUS.
(SCHIZOMYCETES, PSEUDOMONADACEAE)

A b s t r a c t

Examining Burkholder's key for the identification of the bacteria of the genus *Xanthomonas*, in the 7th edition of Bergey's Manual (1957) it is seen that *X. manihotis* (Arthaud — Berthet, 1912) Starr, 1946 and *X. rubrisubalbicans* (Christopher et Edgerton, 1930) Savulescu, 1947, should not be kept in the position they were placed. (l. c., p. 154).

The biochemical characters of *X. manihotis* indicate that to be placed in item II, the author used results obtained from contradictory papers as regard certain basic tests, as will be shown in the sequel.

Burkholder (13) states that the bacterium is not able to hydrolyse starch. The same negative result, with starch, was obtained by Drummond et Hipolito (20). Contrary to these reports, we demonstrated (1) that, in fact, *X. manihotis* does have the capacity to hydrolyse starch. This proof, however, had to be accepted to locate the bacterium in item "1. Starch hydrolysed", of the group of *Xanthomonas* whose colonies are "whitish to cream; pigment non-water soluble". See also Bergey's Manual, 6th ed., 1948. O. 170.

On the other hand, the writer (1), Burkholder (13) and recently Jardim Freire (25) proved that this bacterium is not able to produce nitrites from nitrates. Accepting the contradictory results of Drummond et Hipolito (20), Burkholder placed *X. manihotis* in the item "a. Nitrites produced from nitrates" (12).

In a subsequent paper (2) the writer reported comparative tests with three samples of *X. manihotis* previously studied (1, 13, 20), and demonstrated that all samples have the same morphological, cultural and biochemical characters and that the serological further

proved their identity. These three samples hydrolysed starch and none was able to produce nitrites from nitrates.

It can also be observed that in Burkholder's key (12:154) there is no alternative for the item "A. Gelatin liquefied". In this group one species is included that does not liquefy gelatin (12:176), i. e. *X. rubrisubalbicans*.

The above considerations suggest the following alterations for item II in the key for identification of *Xanthomonas* (12:154).

"II. Colonies whitish to cream: pigment non-water-soluble

A. Gelatin liquified.

1. Starch hydrolyzed.

a. Nitrites produced from nitrates.

54. *Xanthomonas panici*.

55. *Xanthomonas proteamaculans*.

aa. Nitrites not produced from nitrates.

56. *Xanthomonas manihotis*.

2. Starch not reported.

57. *Xanthomonas cannae*.

58. *Xanthomonas conjac*.

59. *Xanthomonas zingiberi*.

B. Gelatin not liquefied.

1. Starch hydrolyzed.

a. Nitrites not reported.

60. *Xanthomonas rubrisubalbicans*.

It is believed that these proposed alterations for that key will contribute to standardization of the presente knowledge of the biochemical characters of *X. manihotis*, and avoid future troubles in relation to starch hydrolysis and nitrate reduction as has been repeated in bacteriology manuals.

For instance, Elliott (22) dit not accept our results (1). On basis of Drummond and Hipolito's (20) and Burkholder's results (13) she states that *X. manihotis* does not hydrolyzes starch. Besides, Elliott not considering Burkholder's views (Bergey's Manual, 6th ed., p. 170, 1948 and 7th ed., p. 176, 1957) reports negative the nitrate reduction for this germ.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — AMARAL, J. F. — 1942 — Estudo do organismo causador da bacteriose da mandioca. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 13: 119-126.
- 2 — AMARAL, J. F. — 1945 — Novos estudos do agente etiológico da bacteriose da mandioca. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 16: 361-368.
- 3 — ANÔNIMO — 1936 — A bacteriose da mandioca. *Almanaque Agrícola Brasileiro*, 24: 174-331.
- 4 — BITANCOURT, A. A. — 1940 — Problemas do Instituto Biológico. *O Biológico*, São Paulo, 7: 322-331.
- 5 — BITANCOURT, A. A. — 1941 — O agente da bacteriose da mandioca. *O Biológico*, São Paulo, 7: 37.
- 6 — BONDAR, G. — 1912 — Uma nova doença bacteriana da mandioca. *Chácaras e Quintais*, 5 (4): 15-18.
- 7 — BONDAR, G. — 1915 — Moléstia bacteriana da mandioca. *Bol. Agric.*, São Paulo, Ser. 16 (6): 513-524.
- 8 — BONDAR, G. — 1939 — Sobre a bacteriose da mandioca. *O Campo*, Rio de Janeiro, 10 (113): 22-23.
- 9 — BONDAR, G. — 1939 — A bacteriose da mandioca. *O Campo*, Rio de Janeiro, 10 (119): 28-30.
- 10 — BONDAR, G. — 1939 — Estudo sobre a bacteriose da mandioca. *Bahia Rural*, Salvador, 7 (71-72): 263-265.
- 11 — BONDAR, G. — 1940 — Sobre a bacteriose da mandioca. *O Campo*, Rio de Janeiro, 11 (132): 64.
- 12 — BREED, R. S. et al. — 1951 — Bergey's Manual of determinative Bacteriology, 7.^a ed., pg. 152-178. The Williams & Wilkins Company, Baltimore, E. U. A.
- 13 — BURKHOLDER, W. H. — 1942 — Three bacterial plant pathogens: *Phytophthora caryophylli* sp. n., *Phytophthora allnicola* sp. n., and *Phytophthora manihoti* (Arthaud-Berthet et Bondar) Viegas. *Phytopathology*, 32: 146-148.
- 14 — BURKHOLDER, W. H. & STARR, M. P. — 1948 — The generic and specific characters of phytopathogenic species of *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, 38: 494-501.
- 15 — CASTRO, J. B. & GONÇALVES, R. D. — 1939 — A bacteriose da mandioca — *Bahia Rural*, Salvador, 6 (69): 225-226.
- 16 — COSTA, A. S. & NORMANHA, E. — 1939 — Nota sobre o tratamento das manivas de mandioca. (*Manihot utilissima* POHL) em água aquecida a diversas temperaturas. *Rev. Agric.*, Piracicaba, 14: 227-230.

- 17 — DESLANDES, J. A. — 1940 — Doenças da mandioca no Nordeste. *O Campo*, Rio de Janeiro, 11 (131): 9-14.
- 18 — DESLANDES, J. A. — 1944 — Observações Fitopatológicas na Amazônia. *Bol. Fitossanitário*, Rio de Janeiro, 1 (3:4): 197-242.
- 19 — DOWSON, W. J. — 1939 — On the systematic position and generic names of the gram negative bacterial plant pathogens. *Zbl. Bakt.* 2 (100): 177-193.
- 20 — DRUMMOND, O. A. & HIPÓLITO, O. — 1941 — Notas sobre a bacteriose da mandioca. *Bol. Esc. Sup. Agric. e Vet.*, Viçosa, 4 (2): 1-148.
- 21 — DUTRA, G. — 1915 — Moléstia bacteriana da mandioca. *Bol. Agric.*, São Paulo, Ser. 16 (10): 911.
- 22 — ELLIOTT, C. — 1951 — Manual of Bacterial Plant Pathogens. 2.^a ed. pg. 125-126 — *Chronica Botanica*, Waltham, Mass. E. U. A.
- 23 — GONÇALVES, R. D. — 1939 — A bacteriose da mandioca no Vale do Paraíba. *O Biológico*, São Paulo, 5: 117-118.
- 24 — GONÇALVES, R. D. — 1953 — A bacteriose e a mandioca guaxupé. *O Biológico*, São Paulo, 19: 114-117.
- 25 — JARDIM FREIRE, J. R. — 1949 — Estudo comparativo entre três isolamentos de *Xanthomonas manihotis* (Arthaud-Berthet) Burk. *Agros*, Pelotas, 2: 93-98.
- 26 — JARDIM FREIRE, J. R. — 1953 — Considerações acerca da provável identidade entre *Bacterium robice* Bour. e *Xanthomonas manihotis* (Arthaud-Berthet) Burk. *Agros*, Pelotas, 6: 111-117.
- 27 — MULLER, A. S. — 1938 — As doenças da mandioca e seu tratamento. *Chácaras e Quintais*, São Paulo, 57 (1): 198-202.
- 28 — PACCA, D. W. — 1937 — Contribuição ao estudo das doenças da mandioca. *Rodriguesia*, Rio de Janeiro, 3: 171-173.
- 29 — RONNA, E. — 1934 — Primeiro catálogo dos parasitos vegetais encontrados até hoje nas culturas do Rio Grande do Sul. *O Campo*, Rio de Janeiro, 5 (3): 17-18.
- 30 — STARR, M. P. — 1946 — The nutrition of phytopathogenic bacteria. *Jour. Bact.* 51: 131-143.
- 31 — VIÉGAS, A. P. — 1940 — Mofa dos afídeos e alelodídeos. *Rev. Agricultura*, Piracicaba, 15: 475-485.

IDENTIFICAÇÃO SOROLÓGICA DE AMOSTRAS DE *LEPTOSPIRA* (*L. HYOS*), ISOLADAS DE SUÍNOS (*)

POR

V. O. Guida

Do Instituto Biológico de São Paulo

Com 1 tabela no texto

Em outra oportunidade (2), ao isolarmos três amostras (RP 27, RP 28 e RP 29) de *Leptospira* de rins de suínos aparentemente normais, procedentes de Rio Claro, Estado de São Paulo, realizamos provas sorológicas (aglutinação-lise) com os sôros imunes seguintes: *L. pomona*, *L. grippotyphosa*, *L. australis* A, *L. ballum*, *L. canicola* e *L. icterohemorrhagiae*, com resultados negativos.

Naquela ocasião não possuíamos a *L. hyos*, que conseguimos agora, por gentileza do Dr. Marcelo Corrêa, do Instituto Adolfo Lutz.

No presente trabalho as três amostras foram estudadas sorologicamente pelo método de aglutinação-lise, usando-se a *L. hyos* (*L. mitis* JOHNSON) como antígeno.

MATERIAL E MÉTODOS

Com as amostras isoladas por nós, foram preparados sôros imunes para as provas de aglutinação-lise. As amostras de *Leptospira* eram conservadas em meio de Verwoorth.

Usamos o método de aglutinação-lise de Schuffner, modificado.

RESULTADOS

Na tabela 1 estão expressos os resultados; nela podemos verificar que os sôros preparados com as amostras isoladas dos suínos aglutinavam a *L. hyos* a 1:3000; resultado idêntico foi obtido com as amostras homólogas.

DISCUSSÃO

O estudo sobre a incidência da leptospirose nos animais domésticos é de extrema importância não só sob o ponto de vista econômico,

(*) Recebido para publicação em 3 de novembro de 1958.

devido aos graves prejuízos que acarreta, como também sob o ponto de vista da saúde pública, porque várias espécies de *Leptospira* eliminadas pelos animais são patogênicas para o homem.

TABELA 1

Prova de aglutinação-lise.

Sôros	ANTÍGENOS			
	RP 27	RP 28	RP 29	<i>L. hyos</i>
	Título aglutinante			
RP 27	1:3000	1:3000	1:3000	1:3000
RP 28	1:3000	1:3000	1:3000	1:3000
RP 29	1:3000	1:3000	1:3000	1:3000

Pesquisas sistemáticas são realizadas nos animais susceptíveis (bovinos, suínos, equínos, ovinos, caprinos e murinos) com o fim de identificar não só portadores como também de eliminar a doença dos rebanhos. Os suínos, principalmente, podem também apresentar uma infecção inaparente e disseminar a *Leptospira* pela urina já que esta se alberga nos rins. Os ratos são portadores da *Leptospira* e não apresentam sintomas da infecção.

Os resultados aqui obtidos, identificando a *Leptospira* (*L. hyos*) isolada dos rins de suínos, mostram que o problema entre nós deve ser tratado com medidas adequadas. A verificação dos portadores, o isolamento e a identificação sorológica das várias espécies aqui existentes, a vacinação dos animais sensíveis, são medidas importantes na solução do problema.

RESUMO

No presente trabalho foram identificadas sorologicamente 3 amostras de *Leptospira* isoladas de rins de suínos aparentemente normais.

Pelo método de aglutinação-lise foi possível demonstrar que as amostras isoladas eram *L. hyos* (*L. mitis* JOHNSON). O título sorológico foi positivo a 1:3000.

CONCLUSÃO

Foi demonstrada a existência da *L. hyos* (*L. mitis* JOHNSON) no Brasil, em porcos procedentes de Rio Claro, Estado de São Paulo.

SOROLOGICAL IDENTIFICATION OF STRAINS OF *LEPTOSPIRA* (*L. HYOS*), ISOLATED OF SWINE

A b s t r a c t

Three strains of Leptospira were isolated from kidney of apparently normal pigs. Using the agglutination-lyse method, it was possible to demonstrate that they were strains of the species L. hyos.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — BRYAN, H. S. — 1958 — Studies on Leptospirosis in domestic animal. VI. Vaccination of swine with *L. pomona bacterin*. *Vet. Med.*, 52 (2): 51-57.
- 2 — GUIDA, V. O. — 1953 — Pesquisas sorológicas de uma amostra de *Leptospira* isolada de porcos. *Arq. Biol. Tecn.*, 7 (3): 21-22.

SÍNTESE DA RIBOFLAVINA PELO *B. POLYMYXA*

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE SUSPENSÕES DESSE MICRORGANISMO
POR VIA ORAL, A RATOS EM AVITAMINOSE EXPERIMENTAL (*)

POR

V. O. Guida e J. P. Forster

Do Instituto Biológico de São Paulo

Com a estampa 7

Em várias pesquisas (1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10) realizadas "in vitro" e "in vivo" foi demonstrado que os germes esporulados aeróbios sintetizam vitaminas. E' provável que esses microrganismos elaborem no solo onde têm o seu "habitat" natural, as vitaminas necessárias ao desenvolvimento de certas plantas. Além disso são poderosos agentes geoquímicos (11), contribuindo para grande número de reações biológicas que se realizam no solo. O *B. polymyxa*, uma das mais importantes bactérias desse grupo, tem sido objeto de numerosas observações clínicas e biológicas.

Nesta pesquisa procurámos verificar a influência do *B. polymyxa*, administrado por via oral a ratos em dieta carente de riboflavina.

MATERIAL E MÉTODOS

O *B. polymyxa* utilizado no trabalho pertence à coleção da Seção de Bacteriologia do Instituto Biológico. Com esse microrganismo foram preparadas, após várias lavagens, suspensões de esporos em solução fisiológica, de modo que cada cm³ contivesse 1 milhão de esporos.

Os ratos utilizados neste estudo, originalmente Wistar, pertenciam à criação do Instituto Biológico; eram do sexo masculino, em idênticas condições de saúde e peso (40 g e 30 dias de idade).

Foram colocados em gaiolas individuais anticoprofágicas (tela de arame com abertura de mais de 8 mm de diâmetro) para evitar a refecação.

(*) Recebido para publicação em 3 de novembro de 1958.

A temperatura da sala era de 25° C. aproximadamente. Adotamos neste trabalho o método descrito por G. Vilela com alterações que julgamos interessante acrescentar.

A dieta basal consistia em:

caseína isenta de vitaminas	18%
amido de mandioca	68%
manteiga	9%
mistura salina	4%
óleo de fígado de bacalhau	1%
suplemento vitamínico —	
tiamina 200 μ em 100 g	
piridoxina 200 μ em 100 g	
pant. cálcio 100 μ em 100 g	
niacina 2.500 μ em 100 g	
água ad libitum	

PREPARAÇÃO: Os ratos utilizados na experiência receberam durante 7 dias a dieta basal e o suplemento vitamínico acima descritos (fase de depleção da vitamina B₂). Após esse período, os animais foram divididos em 4 grupos de acordo com o tratamento adotado:

GRUPO N.º 1 (10 animais), considerado como testemunha, continuou recebendo a alimentação acima descrita.

GRUPO N.º 2 (10 ratos) recebeu a mesma alimentação e 1 μ diário de riboflavina por via oral.

GRUPO N.º 3 (10 ratos) recebeu dieta igual a do grupo 1 e mais 0,5 cm³ da suspensão de *B. polymyxa*, diariamente, por via oral.

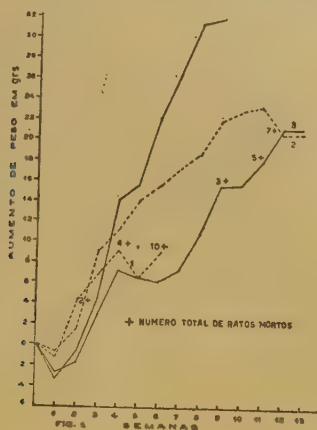
GRUPO N.º 4 (10 ratos) recebeu também a mesma dieta do grupo 1 e um suplemento diário de 1 μ de riboflavina e 0,5 cm³ de esporos de *B. polymyxa* por via oral.

Os animais foram observados durante 13 semanas, anotando-se as modificações que ocorreram no transcurso da experiência devido à ausência da riboflavina (parada de crescimento, catarata, alopecia, etc.).

RESULTADOS

A FIGURA 1 mostra os resultados obtidos.

Fig. 1 — Efeito da administração de suspensões de esporos do *B. polymyxa*, por via oral, na sobrevivência e peso de ratos tratados com uma dieta isenta ou de baixo teor de riboflavina.



Explicação da Fig. 1.

Os ratos receberam a dieta:

- 1) Sem riboflavina.
- 2) com 1μ de riboflavina, diariamente.
- 3) com 0,5 cc da suspensão de esporos do *B. polymyxa*, diariamente.
- 4) com 0,5 cc da suspensão de esporos do *B. polymyxa*, e 1μ de riboflavina, diariamente.

No lote 1, que recebeu unicamente a dieta isenta de riboflavina, houve a ocorrência de 100% de morte dos ratos (2 na terceira semana, 4 na quarta e 4 na sexta semana) com os sintomas típicos de arriboflavinose.

O grupo 2, tratado com 1μ de riboflavina, apresentou no fim da 13.^a semana, uma média de ganho de peso de 20 g e sintomas de avitaminose.

No lote 3, de ratos que receberam a dieta isenta de riboflavina e a suspensão do *B. polymyxa*, ocorreu 70% de morte e os ratos remanescentes apresentaram um aumento de 20 g, com sintomas de avitaminose tão pronunciados como no grupo anterior.

No grupo 4, tratado com 1μ de riboflavina e a suspensão de esporos de *B. polymyxa*, a média de ganho de peso dos ratos foi, no

fim da 13.^a semana, de 43 g, o dobro, portanto, do lote que recebeu só a riboflavina (grupo 2). Os animais assim tratados, apresentaram aspecto sadio, sem depilações e sem lesões oculares.

DISCUSSÃO

Os germes esporulados aeróbios elaboram um complexo de substâncias ativas que aceleram o metabolismo celular. Nesse complexo microbiano estão incluídas várias substâncias conhecidas, cuja existência já foi demonstrada, outras ainda desconhecidas ou apenas suspeitadas que agem em um sincronismo metabólico estimulando as funções vitais do organismo (6). Uma análise completa desses fatores irá aumentar o nosso conhecimento sobre o valor biológico desses microrganismos como agentes estimulantes do metabolismo celular. Pesquisas realizadas “in vivo” e “in vitro” já demonstraram que várias bactérias esporuladas aeróbias produzem antibióticos, enzimas e vitaminas. Como é do nosso objetivo demonstrar todas as propriedades dos germes esporulados aeróbios, procuramos neste trabalho verificar qual seria o resultado da administração do *B. polymyxa*, por via oral, a ratos com dieta isenta de riboflavina.

Vários lotes de ratos recebendo diferentes tratamentos foram comparados entre si, após um período de depleção da riboflavina.

Os resultados mostram que o *B. polymyxa* estimula o crescimento dos ratos (43 g em média, em 13 semanas) quando associado a uma pequena quantidade de riboflavina (1 μ) que isoladamente é incapaz de apresentar o mesmo efeito (20 g de aumento de peso em média). Neste último caso, os ratos apresentaram sintomas de carência de riboflavina.

Quando o *B. polymyxa* foi dado isoladamente não conseguiu impedir aparecimento dos sintomas de avitaminose e a morte dos animais. O grupo testemunha, que recebeu somente a dieta isenta de riboflavina, apresentou os sintomas típicos de arriboflavinose e morte rápida.

Como poderíamos explicar a ação da suspensão do *B. polymyxa*, associada a 1 μ de riboflavina? Várias hipóteses poderiam ser formuladas:

- 1) Aumentaria a absorção da riboflavina no intestino pela melhora das condições locais.
- 2) O *B. polymyxa* sintetizaria riboflavina e completaria com 1 μ administrado a quantidade necessária para a exigência normal do organismo.

- 3) O *B. polymyxa* agiria como biocatalizador da riboflavina no intestino.

Êsses problemas estão em aberto para serem focalizados oportunamente.

CONCLUSÃO

O *B. polymyxa* associado a 1 μ de riboflavina diariamente estimula o crescimento de ratos; o pêso dêsses animais atingiu, na 13.^a, semana, a 43 g em média, o dobro do pêso dos ratos tratados unicamente com 1 μ de riboflavina.

RESUMO

Os autores investigaram nêste trabalho a síntese de riboflavina pelo *B. polymyxa*, em ratos submetidos a uma dieta isenta de riboflavina. 4 grupos de 10 ratos foram usados. O 1.^o grupo recebeu uma dieta experimental. Os outros 3 grupos foram alimentados da mesma maneira, e receberam também, respectivamente, por via oral, 1 μ de riboflavina; 0,5 cc de uma suspensão de *B. polymyxa*, e uma associação de 1 μ de riboflavina e 0,5 cc dessa mesma suspensão bacteriana.

Após 13 semanas de tratamento pode-se concluir que tanto a suspensão de *B. polymyxa* como 1 μ de riboflavina eram incapazes, isoladamente, de impedir o aparecimento dos sintomas de carência, ou mesmo a morte; quando eram associadas as duas substâncias havia um sensível aumento de pêso dos ratos, o dobro dos grupos precedentes, os animais não apresentavam sintomas de avitaminose e a sobrevivência era de 100%. Os ratos que recebiam a dieta experimental morreram na 6.^a semana.

STUDIES ON THE RIBOFLAVIN SYNTHESIS BY *B. POLYMYXA*. EFFECTS OF ADMINISTRATION OF SUSPENSION OF *B.* *POLYMYXA*, BY ORAL ROUTE, TO RATS SUBJECTED TO EXPERIMENTAL AVITAMINOSIS

A b s t r a c t

The administration of 0.5 ml of a suspension of spores of *B. polymyxa* and 1 μ of riboflavin, daily, by oral route, to young rats fed with a riboflavin free-basal ration, produced a weight gain of 43 g, and prevented clinical manifestation of vitamin deficiency.

The administration of 1 μ of riboflavin or 0.5 ml of a suspension of spores of B. polymyxa to other rat groups produced a weight gain of only 20 g and did not prevent the symptoms of avitaminosis and death.

The rats of the control group (riboflavin free-basal ration) died within six weeks, with alopecia due to avitaminosis.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — ALMQUIST, H. J., PENTIER, C. F. & MECCHI, E. — 1938 — Syntheses of the antihemorrhagic vitamin by bacteria. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, **33**: 336-338.
- 2 — BURKHOLDER, P. R. & MAC VEIGHT, I. — 1942 — Synthesis of vitamins by intestinal bacteria. *Proc. Nat. Acad. Sci., U. S.*, **28**: 258-289.
- 3 — GUIDA, V. O., FARIA, A. I. & FORSTER, J. P. — 1958 — Microrganismos saprófitas como fonte de vitaminas. Síntese de vitaminas B₁, B₁₂ e ácido nicotínico por bactérias esporuladas aeróbias. *Rev. Bras. Gastroent.*, **10** (3): 137-144.
- 4 — GUIDA, V. O. & CORRÊA, R. — 1957 — Dosagem do teor de vitamina B₁₂ contida no corpo bacteriano e nos filtrados de cultura de bacilos esporulados aeróbios. *An. Farm. e Química*, **8** (7-8), 6-12.
- 5 — GUIDA, V. O. & FORSTER, J. P. — 1957 — Síntese de tiamina por bactérias saprófitas no tracto intestinal de ratos. *Rev. Bras. Gastroent.*, **9** (4): 169-182.
- 6 — GUIDA, V. O., ZUCCAS, A. W. & GUIDA, H. A. — 1958 — Estudos sobre a ação estimulante do *B. coagulans*, *B. polymyxa* e *B. subtilis*, administrados por via oral, no desenvolvimento de crianças normais de 3-5 anos de idade. *Rev. Brasil. Med.*, **15** (7): 481-484.
- 7 — GUHA, B. C. — 1932 — The synthesis of vitamin B₁ and B₁₂ by *B. vulgaris*. *Ind. J. Med. Res.*, **19**: 977-983.
- 8 — LANDY, M., SARKUM, N. W. & OSWALD, E. J. — 1943 — Bacterial synthesis of p-amino benzoic acid. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, **52**: 338-341.
- 9 — LANDY, M. & DICKENS, D. M. — 1941 — Biotin synthesis by microorganisms. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, **46**: 1086-1092.
- 10 — RODERS, N. E. — 1942 — The synthesis of riboflavin by microorganisms. Ph. D. Thesis, University of Wisconsin.
- 11 — ROGER Y STAMER, MICHEL DONDOROFF & EDWARD A. ADELBERG. — 1957 — The Microbial World, Prentice-Hall, Inc. N. J., U. S.

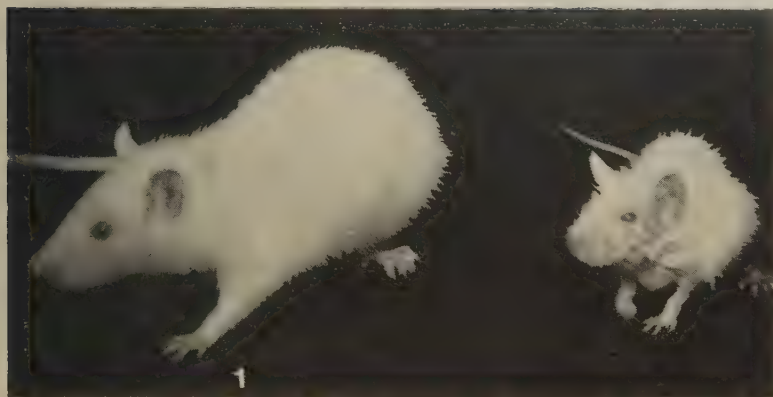


Fig. 1 — Rato 1 recebeu 1μ de riboflavina e 0,5 ml de uma suspensão de esporos de *B. polymyxa*, durante 13 semanas, aumentou 43 g de peso e não apresentou sintomas de avitaminose; o rato número 2, tratado com uma dieta basal isenta de riboflavina, apresentou sintomas típicos de avitaminose.



Fig. 2 — Rato n.º 1, recebeu 1μ de riboflavina e 0,5 ml de uma suspensão de esporos do *B. polymyxa*, durante 13 semanas, apresentou um aumento de peso de 43 g; o rato n.º 2 recebeu unicamente 1μ de riboflavina, aumentando apenas 23 g, no mesmo período.

O EMPRÊGO DE DISCOS DE FÓLHAS DE *NICOTIANA GLUTINOSA* PARA DETERMINAR A ATIVIDADE DAS SUSPENSÕES DE VÍRUS DO MOSAICO DO FUMO (*)

POE

M. Meneghini

Do Instituto Biológico de São Paulo

Com 3 figuras e 3 tabelas no texto

Desde que HOLMES (2, 1929) observou a formação de lesões necróticas em folhas de *Nicotiana glutinosa* inoculadas com o vírus do mosaico do fumo, foram publicados muitos trabalhos em que se procurou determinar a relação entre o número dessas lesões e a concentração da suspensão aplicada. Além da concentração, porém, outros fatores podem igualmente influir no número de necroses produzidas por uma determinada suspensão de vírus, e grande parte desses trabalhos foi dedicada ao estudo das possibilidades de se atenuar ou eliminar os efeitos que as variações desses fatores — em geral incontrolláveis — têm sobre os resultados dos ensaios. Dentre eles a variação da suscetibilidade das folhas ao vírus tem merecido especial e justificável atenção.

SAMUEL e BALD (5, 1933) mostraram que as duas metades de uma folha de *Nicotiana glutinosa*, determinadas pela nervura principal, quando inoculadas com a mesma suspensão de vírus, apresentam lesões em quantidades aproximadamente iguais entre si. E' possível, portanto, determinar-se com bastante segurança se duas suspensões são ou não da mesma concentração, inoculando-se com elas as duas metades opostas de um certo número de folhas. Contudo, a aplicação direta desse simples processo, para determinar a relação quantitativa entre as duas concentrações, só seria possível se a relação entre o número de lesões e a concentração fôsse de simples proporcionalidade.

Se assim fôsse, para se determinar a concentração de uma suspensão, bastaria inoculá-la ao lado de outra de concentração conhecida. Mas, seja qual fôr a função que ligue o número de lesões à concentração, ela, sem dúvida alguma, tem mais de um parâmetro (YAUDEN, BEALE e GUTHRIE, 6, 1935; BALD, 1, 1935; KLECZKOWSKI, 3, 1950), portanto, duas ou mais suspensões de concentrações conhecidas deveriam ser inoculadas simultaneamente com a

(*) Recebido para publicação em 23 de abril de 1958.

suspensão cuja concentração se desejasse conhecer. O emprêgo das quatro meias folhas primárias de pequenas plantas de feijão, que também apresentam lesões quando inoculadas com o vírus do mosaico do fumo (PRICE, 4, 1930), poderia, provavelmente, atender a essa necessidade.

Verificamos, porém, que discos retirados de folhas de *Nicotiana glutinosa*, inoculados com o vírus do mosaico do fumo e guardados em câmara úmida, também desenvolvem lesões locais. Conseqüentemente, torna-se possível retirar, de um grupo de folhas, um número relativamente grande de amostras comparáveis — tôdas incluindo igual número de discos de cada folha. Por outro lado, êsse fato cria a possibilidade de se empregar dispositivos que tornem possível levar a efeito a infecção de tôdas as amostras simultâneamente e em igualdade de condições, sobretudo no que diz respeito à pressão sob a qual a inoculação é realizada — fator que tem uma grande influência no número de lesões produzidas. Além disso, é possível que o emprêgo dêsses discos possa constituir uma solução satisfatória para os casos freqüentes em que, por outros motivos além do exposto, se imponha a necessidade de se inocular, numa só experiência, um número de amostras comparáveis maior que as quatro possíveis com o emprêgo direto das meias folhas primárias das plantas de feijão.

Julgamos, portanto, que seria interessante estudar essas possibilidades. Restringimo-nos inicialmente ao desenvolvimento de um método de inoculação apropriado, verificando a variação do número de lesões por êle produzidas em quatro amostras comparáveis inoculadas com a mesma suspensão de vírus.

MATERIAL E MÉTODO

Empregamos nas nossas experiências discos de 16 mm de diâmetro retirados de folhas de *Nicotiana glutinosa* por meio de um furador de rolhas. Pode-se retirar facilmente quatro discos de cada meia folha de tamanho médio e mesmo oito quando se trata de folhas grandes. Mas na maioria dos casos retiramos apenas dois — bem próximos um do outro para diminuir a variação devida à posição na folha.

Em geral empregamos 64 folhas para cada ensaio. Quatro discos de cada folha eram distribuídos, segundo as indicações em algarismos arábicos que constam da figura 2, sôbre uma placa de vidro coberta por um pano de veludo bem distendido (fig. 1). Os 256 discos assim distribuídos formavam 16 grupos de 16 discos. Tomando-se um dêsses grupos de cada uma das quatro fileiras obtem-se uma amos-

tra que contém um disco de cada uma das 64 fôlhas empregadas. Quatro amostras de 4 grupos podem assim ser formadas, obedecendo-se ao esquema do quadrado latino (ver indicações em algarismos romanos da fig. 2). Dessa maneira pode-se avaliar simultâneamente o efeito de quatro suspensões de concentrações diversas.

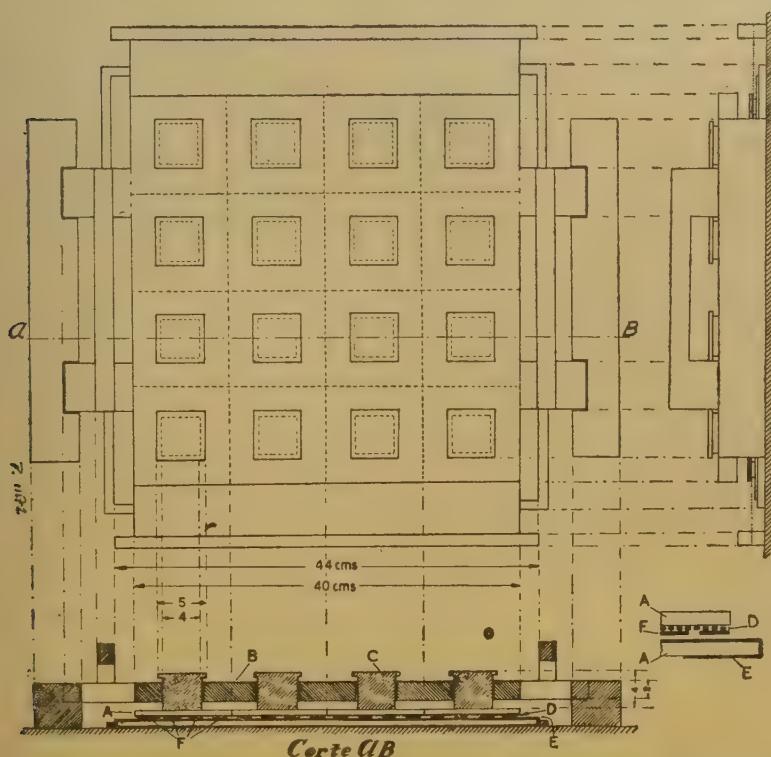


Fig. 1 — Dispositivo para inoculação dos discos de fôlhas de *Nicotiana glutinosa*

- A. Placas de vidro
- B. Estrutura de madeira
- C. Pêso de chumbo
- D. Tela de plástico

Inicialmente, contudo, inoculamos tôdas as amostras com uma única suspensão para verificarmos qual seria nessas condições a variação entre o número de necroses por elas apresentadas. Usamos como inóculo uma suspensão em tampão de fosfato 0,01 M de pH 7

de vírus do mosaico do fumo parcialmente purificado por meio de centrifugações diferenciais. Duas gotas da suspensão eram colocadas sobre cada um dos discos distribuídos sobre o pano de veludo.

Nos nossos primeiros ensaios, sobre os discos com a suspensão de vírus era colocada uma placa esmerilhada de vidro que, movimentada horizontalmente, procedia à inoculação. Posteriormente essa placa foi substituída por uma tela de fios de plástico de 60x60 "meshes" e de dimensões um tanto superiores às da placa de vidro inferior, que media 44x44 cm (fig. 1). Sobre a tela foram colocadas 16 placas de vidro de 10x10 cm formando, em conjunto, um quadrado de 40x40 cm. Sob cada uma dessas placas ficava um dos 16 grupos de 16 discos. Um pêso de chumbo de 730 g foi preso com cola de borracha à cada uma das placas. Esses pêsos com as respectivas placas foram fixados por uma estrutura de madeira de forma a terem livre apenas o movimento vertical. Somente a tela tinha livre o movimento horizontal, por meio do qual era realizada a inoculação. Esse movimento era levado a efeito puxando-se a tela, alternativamente, em dois sentidos opostos. Acreditamos, porém, que um dispositivo que deixasse livre um espaço para ela ser movimentada também numa segunda direção, perpendicular à primeira, poderia proporcionar melhores resultados.

Quando suspensões de concentrações diferentes estão sendo testadas ao mesmo tempo, para que seja evitada a sua mistura, o deslocamento horizontal da tela não deverá ser superior à distância livre existente entre os grupos de 16 discos. No nosso caso essa distância era de 2 cm e, embora tivéssemos usado apenas uma suspensão de vírus, fizemos com que o deslocamento não ultrapassasse essa distância. Como, porém, movimentamos a tela duas vezes em cada um dos sentidos referidos, houve sempre um deslocamento total de quase 8 cm.

Depois de realizada a inoculação, a estrutura de madeira com os pêsos, e a tela, eram retiradas de sobre os discos e estes transferidos para uma câmara úmida, na mesma disposição em que se encontravam.

A transferência dos discos para a câmara úmida, assim como a sua distribuição sobre o veludo, deve ser levada a efeito cuidadosamente para evitar qualquer ferimento aos tecidos. Realizamos essas operações com o auxílio de um pequeno aparelho que se encontra representado na figura 3. Trata-se de um tubo de vidro de aproximadamente 15 cm de comprimento e de 7 mm de diâmetro, tendo uma das suas extremidades ligada à trompa de vácuo por meio de um tubo bastante longo e flexível. A outra extremidade, um tanto afilada, é

guarnecida por um curto tubo de borracha macia e de pequeno diâmetro interno. Fechando-se com o dedo indicador um orifício praticado lateralmente no tubo de vidro, pode-se, por ação do vácuo, prender o disco à ponta de borracha, transportá-lo para o lugar desejado e aí — abrindo-se o referido orifício — soltá-lo.

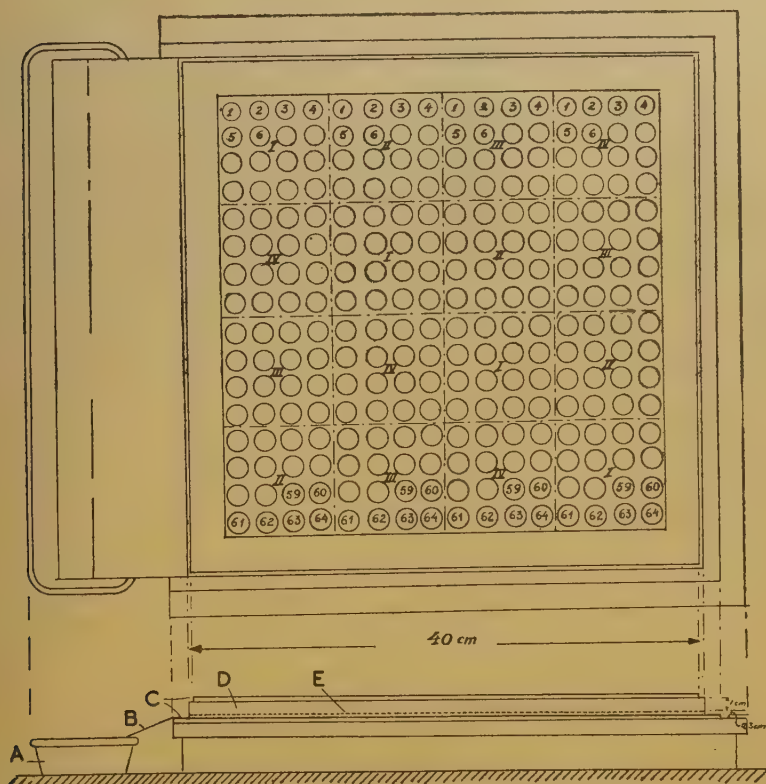


Fig. 2 — Câmara úmida

- A. Recipiente com água
- B. Folha de papel de filtro
- C. Placas de vidro
- D. Quadro de madeira
- E. Tela de plástico

A câmara úmida era constituída por uma tela de plástico dis-tendida por uma moldura de madeira pintada a óleo (fig. 2). Esse

quadro era colocado sôbre uma placa de vidro coberta por uma fôlha de papel de filtro que tinha uma das suas extremidades mergulhada na água. Para manter-se o ambiente úmido, era colocada outra placa de vidro cobrindo o quadro. A tela de plástico, sôbre a qual eram colocados os discos, ficava, em virtude de sua posição na moldura, a 3 mm do papel de filtro úmido e a 1 cm da placa de vidro superior.

Em geral os discos permaneciam nessa câmara durante três dias — tempo êste suficiente para o aparecimento das lesões, que eram então contadas. A contagem era feita obedecendo-se às já referidas indicações em algarismos romanos da figura 2. Obtinha-se assim o número de lesões produzidas nas quatro amostras.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos nossos primeiros ensaios, conforme já dissemos, empregamos para realizar a inoculação apenas uma placa esmerilhada de vidro que, movimentada horizontalmente, atritava a superfície dos

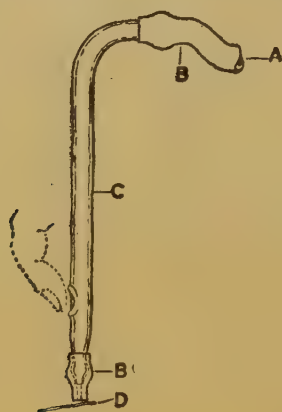


Fig. 3 — Manipulador para a distribuição dos discos de fôlhas

- A. Para a trompa de vácuo
- B. Tubos de borracha
- C. Tubo de vidro
- D. Disco de fôlha

discos dispostos sôbre o veludo. O veludo tinha por função acolchoar os discos, para evitar que a pressão nas proximidades das nervuras fôsse muito superior à da exercida no resto da superfície dos discos, e, além disso, impedir que êles se deslocassem, acompanhando o movimento da placa esmerilhada, por ocasião da inoculação.

Verificamos, contudo, que apenas com o pêso próprio da placa o número de lesões produzidas era muito pequeno. Colocamos, por isso, pêsos diversos sôbre essa placa e os resultados que obtivemos estão reunidos na tabela 1.

TABELA 1

VARIAÇÃO DO NÚMERO DE LESÕES OCASIONADAS PELA VARIAÇÃO DA PRESSÃO

Número total de lesões em 64 discos de 16 mm de diâmetro de *Nicotiana glutinosa* inoculados com uma suspensão contendo aproximadamente 0,2 mg/ml de vírus do mosaico do fumo. Placa de vidro de 30x30 cm.

Pêso total Kg	Número de lesões
1,5	37
3,0	272
6,0	1039

Esses resultados demonstraram claramente que a pressão exercida sôbre a superfície do disco por ocasião da inoculação tem grande influência sôbre o número de lesões produzidas.

Verificada essa influência, realizamos uma série de ensaios com 256 discos divididos em quatro amostras, utilizando-nos para a inoculação duma placa esmerilhada de vidro de 30x30 cm sôbre a qual foi colocado um pêso de 6 kg. Os resultados dos ensaios 12, 16 e 17 da tabela 2 foram obtidos dessa maneira.

Apesar da concentração da suspensão de vírus ter sido a mesma, os resultados variaram muito de um ensaio para outro. As causas dessas diferenças devem ser diversas, mas, a mais importante é, com certeza, a diferença da suscetibilidade ao vírus, das plantas usadas em cada ensaio. Intervalos de muitos dias e mesmo semanas decorreram entre a realização de cada um dêsses ensaios e as plantas, realmente, diferiam muito na idade e aspecto. O nosso interêsse, porém, estava focalizado na variação existente entre as quatro amostras de cada ensaio. Essa variação, nos três casos em apreço, é também muito grande. Todavia, conforme veremos, ela foi reduzida consideravelmente nos ensaios que se seguiram.

Os fatores responsáveis por essa falta de uniformidade dos resultados das quatro amostras poderiam ser os seguintes: (a) Placa

superior não esmerilhada uniformemente em toda sua superfície. (b) Possíveis curvaturas das superfícies das placas de vidro. (c) Pressão não uniforme sobre os discos, resultante, principalmente, do deslocamento irregular do centro de gravidade do pêso ao se movimentar a placa superior para realizar a inoculação.

TABELA 2

NÚMERO DE LESÕES PRODUZIDAS EM 4 AMOSTRAS INOCULADAS
SIMULTANEAMENTE.

Amostras de 64 discos de *Nicotiana glutinosa* inoculadas com uma suspensão contendo aproximadamente 0,2 mg/ml de vírus do mosaico do fumo. Placa superior de 30x30 cm sob um pêso de 6 kg.

Ensaio N.º	Número total de lesões em 64 discos Amostras N.º				Coeficiente de variação
	I	II	III	IV	
12	139	162	182	135	0,13
16	239	142	194	264	0,25
17	71	47	43	62	0,29

Foi procurando eliminar essas possíveis causas de erro que construímos o dispositivo representado na figura 1. Nêle a pressão é melhor distribuída, o efeito da curvatura é reduzido colocando-se sobre a tela um conjunto de pequenas placas — ao invés de uma única grande — e os pêsos não mais se deslocam quando se efetua a inoculação; apenas a tela de plástico se movimenta, atritando a superfície dos discos.

Os resultados de três ensaios realizados com êsse aparelho constam da tabela 3.

Pelas mesmas razões atrás expostas, o número de lesões variou muito de um ensaio para outro. Mas, a variação entre as quatro amostras — cujo exame era o que mais importava na ocasião — diminuiu muito em relação às experiências anteriores, descendo a um nível que pode ser considerado bastante baixo, mesmo em relação aos resultados que podem ser obtidos com o método das meias fôlhas opostas. Fazendo-se, por exemplo, uma comparação dos nossos resultados com os obtidos por SAMUEL e BALD (5, 1933), verifica-se que,

porcentualmente, as diferenças máximas entre as 4 amostras dos nossos ensaios, em média, não são superiores às diferenças existentes entre as lesões produzidas num certo número de meias fôlhas opostas de área comparável à de 64 discos. Um cálculo aproximado dêsses últimos dados pode ser feito a partir dos resultados que constam da tabela IV do referido trabalho.

TABELA 3

NÚMERO DE LESÕES PRODUZIDAS EM 4 AMOSTRAS INOCULADAS
SIMULTANEAMENTE.

Amostras de 64 discos de *Nicotiana glutinosa* inoculadas com uma suspensão contendo aproximadamente 0,7 mg/ml de vírus do mosaico do fumo. Tela de plástico, placa superior dividida em 16 partes e pêsos fixos.

Ensaio N.º	Número total de lesões em 64 discos Amostras N.º				Coeficiente de variação
	I	II	III	IV	
19	20	20	21	17	0,08
20	160	178	183	177	0,05
21	674	598	658	704	0,06

CONCLUSÕES

Com o método que acabamos de expôr, apesar da grande variação de suscetibilidade entre as plantas e entre as próprias fôlhas de uma mesma planta e da área total inoculada relativamente pequena, parece-nos ser possível a determinação simultânea, sem grande erro, do efeito de quatro ou mais suspensões de vírus do mosaico do fumo. O método precisa ainda ser estudado sob outros aspectos, como seja o da sua sensibilidade e, se possível, melhorado. Aliás, acreditamos que as possibilidades para o seu aperfeiçoamento ainda não foram esgotadas.

A tela de plástico de que nos utilizamos parece não ser um material tão eficiente para a inoculação quanto a placa esmerilhada de vidro. Com ela tivemos que usar uma suspensão de vírus mais concentrada para obtermos um número razoavelmente alto de lesões. Talvez fôsse interessante voltarmos ao uso da placa de vidro, mas ela, então, teria que ser esmerilhada muito uniformemente e, para

se ajustar melhor à placa inferior, deveria ser cortada em pequenos quadrados que correspondessem aos grupos de 16 discos e se movimentassem conjuntamente quando da inoculação. É provável, contudo, que a eficiência do dispositivo com a tela possa ser melhorado aumentando-se a pressão sobre os discos.

Um dispositivo que permitisse variar essa pressão segundo a concentração das suspensões empregadas poderia, por outro lado, ser útil para aumentar a exatidão e a sensibilidade do método, elevando ou abaixando o número de lesões ao nível que fôsse mais conveniente.

RESUMO

Observamos que discos de folhas de *Nicotiana glutinosa* inoculados com o vírus do mosaico do fumo e guardados em câmara úmida durante dois ou três dias também produzem lesões necróticas. Consequentemente torna-se possível obter-se de um grupo de folhas, quatro ou mais amostras comparáveis — tôdas incluindo o mesmo número de discos de cada folha — para os ensaios em que seja necessário determinar-se a atividade das suspensões de vírus pelo número de lesões que elas produzem.

Foi possível planejar e estudar um dispositivo que permitiu a inoculação simultânea de todos os discos que compunham quatro amostras, sob uma pressão que, independentemente da habilidade do operador, era igual para todos êles.

A variação do número de lesões apresentadas por quatro amostras de 64 discos inoculados com êsse dispositivo foi promissoramente pequena.

Obtivemos também alguns resultados que mostram claramente que é grande a variação do número de lesões ocasionada pela variação da pressão sob a qual os discos são inoculados.

USE OF LEAF-DISKS OF *NICOTIANA GLUTINOSA* TO DETERMINE ACTIVITY OF TOBACCO MOSAIC VIRUS SUSPENSIONS

Abstract

*Local lesions were observed to be produced by tobacco mosaic virus on small disks of leaves of *Nicotiana glutinosa* maintained in a moist chamber (fig. 2) for 2 or 3 days following inoculation.*

This fact affords a way of obtaining from a batch of leaves 4 (or more) comparable samples — each one containing the same

number of disks from each leaf — that may be useful for studying the relationship between the virus concentration and the number of local lesions and for estimating the amount of active particles in a virus suspension.

Furthermore, by using these disks, it was also possible to devise a technique for inoculating all the samples simultaneously and under the same pressure (fig. 1). The number of local lesions may vary considerably according to the pressure under which the inoculation is performed (table 1).

The variation of the number of local lesions produced on four 64-disk samples inoculated with the same virus suspension was small, in spite of the variable susceptibility of the leaves and of the rather small total area of inoculated leaf surface (table 3).

BIBLIOGRAFIA

- 1 — BALD, J. G. — 1935 — Statistical aspect of the production of primary lesions by plant viruses. *Nature*, **135**: 996.
- 2 — HOLMES, F. O. — 1929 — Local lesions in tobacco mosaic. *Bot. Gaz.*, **87**: 39-55.
- 3 — KLECZKOWSKY, A. — 1950 — Interpreting relationships between the concentrations of plant viruses and number of local lesions. *J. Gen. Microbiol.*, **4**: 53-69.
- 4 — PRICE, W. C. — 1930 — Local lesions on bean leaves inoculated with tobacco mosaic virus. *Amer. J. Bot.*, **17**: 694-702.
- 5 — SAMUEL, G. & J. G. BALD — 1933 — On the use of the primary lesions in quantitative work with two plant viruses. *Ann. Appl. Biol.*, **20**: 70-99.
- 6 — YODEN, W. J., H. P. BEALE, & J. D. GUTHRIE — 1935 — Relation of the virus concentration to the number of lesions produced. *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, **7**: 37-53.

ANÁLISE DOS INSETICIDAS FOSFORADOS (*)

POR

N. F. Almeida e J. R. Piedade
Do Instituto Biológico de São Paulo

Com 2 tabelas no texto

INTRODUÇÃO

O emprêgo dos inseticidas fosforados iniciou-se com os trabalhos de GERHARD SCHRADER, que sintetizou cerca de 300 compostos orgânicos fosforados, os quais revelaram ser altamente tóxicos aos insetos, apresentando um índice de 100% de mortalidade mesmo quando diluídos a 0,002%.

Desde então, êstes inseticidas têm se firmado cada vez mais no mercado, notadamente agora com a variada série dos inseticidas sistêmicos.

Convém salientar, entretanto, a alta toxicidade dêsses produtos tanto para os insetos como para os animais de sangue quente, pois êles inibem a ação de um enzima denominado colinesterase.

MÉTODOS ANALÍTICOS

As determinações dos numerosos inseticidas fosforados são baseadas em reações específicas a cada um dêles ou então na determinação do fósforo orgânico total.

Os métodos baseados em reações específicas, embora apresentem resultados excelentes, não se coadunam com as exigências de um laboratório de rotina onde se tem em mira convergir para um único processo geral que apresente resultados idênticos, aliando-se desta forma dois predicados essenciais a um processo de controle, que são a eficiência e a rapidez.

DETERMINAÇÃO DO FÓSFORO ORGÂNICO TOTAL

O método que será descrito é baseado na determinação do fósforo orgânico sob forma de fosfomolibdato de amônio.

Embora seja clássica a determinação do fósforo por êste processo, nem sempre se chega a resultados satisfatórios, porquanto

(*) Recebido para publicação em 25/11/58.

existem várias dificuldades de ordem técnica que o tornam de difícil execução, dificuldades estas que tentamos suprimir através de várias modificações.

PRINCÍPIO DO MÉTODO: O fósforo do composto orgânico é oxidado, com H_2SO_4 e HNO_3 concentrados, a fosfato inorgânico, sendo que êste é por sua vez determinado alcalinimètricamente, depois de precipitado pelo molibdato de amônio.

TÉCNICA: Pesar 1 g do produto técnico e transferir para um Erlenmeyer de 500 ml adicionando a seguir 25 ml de H_2SO_4 e 5 ml de HNO_3 concentrados.

Aquecer ligeiramente até que a primeira etapa da reação, que é violenta, termine. Em seguida adicionar sucessivamente pequenas porções de HNO_3 conc., até que toda a matéria orgânica esteja destruída, o que se percebe facilmente pelo não aparecimento de vapores nitrosos vermelhos e pela completa clarificação da solução.

A amostra oxidada é transferida para um balão volumétrico de 500 ml, completando-se o volume com água destilada. Retira-se uma alíquota de 50 ml, transfere-se para um bequer de 200 ml, adicionando-se 3 gotas de vermelho de metila e NH_4OH conc. até que a solução esteja alcalina.

Antes da neutralização se ter completado, adicionar mais 3 gotas de vermelho de metila, pois êste é oxidado lentamente pelo HNO_3 . Feito isto, adicionar HNO_3 conc., gota a gota, até que o indicador se torne vermelho.

Diluir a solução com água destilada a cerca de 100 ml e aquecer entre 40-45° C, pois, se aquecida acima de 45° C, o óxido molíbdico precipita.

Adicionar então lentamente 30 ml do reagente molíbdico e agitar a suspensão continuamente por não menos do que 2 minutos.



Deixar o precipitado amarelo decantar e verificar se houve precipitação total, adicionando 2 ml do reagente molíbdico à solução. Se um precipitado se formar, adicionar mais 15 ml do reagente, agitar e deixar em repouso até que a precipitação seja completa.

Desde que H_2SO_4 conc. tenha sido usado para digerir a amostra, a formação do precipitado amarelo pode ser retardada, deve-se então, esperar 1 hora para que se complete a precipitação.

Filtrar a solução em papel "SS n.º 589 Blue Band", lavar o

precipitado, bequer e papel de filtro com água destilada verificando no final, se o filtrado dá reação ácida. Para isto, receber num tubo de ensaio cerca de 5 ml do filtrado, adicionar 1 gota de fenolftaleína e verificar se 1 gota de NaOH 1,0 N provoca a viragem, caso contrário, continuar a lavagem.

Colocar o papel de filtro no bequer primitivo e adicionar 20 ml de NaOH 1,0 N agitando para dissolver o precipitado. Adicionar então 50 ml de água destilada, 5 gotas de fenolftaleína e titular com H_2SO_4 1,0 N adicionando algumas gotas em excesso.

Terminar a titulação pela adição de NaOH 1,0 N até o aparecimento da cor rósea.



CÁLCULO: $23 NaOH = (NH_4)_3PO_4 \cdot 12MoO_3$

$$1 NaOH = \frac{(NH_4)_3PO_4 \cdot 12MoO_3}{23} \quad \text{ou} \quad \frac{P}{23}$$

portanto, 1 ml de NaOH 1,0 N corresponde a 0,001347 g de fósforo.

$$\% \text{ de Fósforo total na amostra} = \frac{\text{ml de NaOH 1,0 N} \times 0,001347 \times 100}{\text{Tomada de amostra}}$$

Para o cálculo de cada inseticida, em particular, o teor de fósforo obtido deve ser multiplicado por um fator referente à porcentagem deste elemento na molécula do inseticida. Vários desses fatores foram por nós calculados (Tabela 2).

REAGENTE MOLÍBDICO: Solução (a) — Dissolver 100 g de molíbdato de amônio numa mistura de 400 ml de água destilada e 80 ml de NH_4OH .

Solução (b) — Diluir 400 ml de HNO_3 conc. em 600 ml de água destilada.

Misturar uma parte de solução (a) com duas partes da solução (b) imediatamente antes do uso.

DISCUSSÃO DO MÉTODO

A destruição da matéria orgânica foi feita com ácido sulfúrico e ácido nítrico, sem necessidade da adição do nitrato de sódio, como preconiza Foulk e col. (1952).

Quanto à adição do reagente molíbdico, verificamos ser de grande importância a agitação constante, pois, se o material fôr deixado em repouso ou apenas agitado de modo intermitente, os resultados não serão concordantes, em virtude de não se obter uma precipitação completa do fosfomolibdato de amônio.

Também é fundamental que a temperatura da reação se mantenha dentro dos limites de 40 a 45° C, para evitar a precipitação do óxido molíbdico, o que ocorre em temperaturas mais elevadas. Este ponto é salientado por FOULK e col. (1952), mas não é mencionado por KOLTHOFF e SANDELL (1952).

Quanto à parte da filtração do precipitado, FOULK e col. (1952) referem ser necessário fazê-la em cadinho de "Gooch". KOLTHOFF e SANDELL, entretanto, preconizam o uso de papel de filtro quantitativo para essa operação. Verificamos que a filtração em papel de filtro, pode ser feita sem interferir na precisão do método e tem a grande vantagem de facilitar a execução do trabalho. Notamos ainda que, durante as operações de filtração e lavagem, o funil deve ficar permanentemente com água para evitar a passagem do precipitado, o que pode ocorrer se o material ficar seco.

FOULK e col. aconselham efetuar a lavagem com solução de nitrato de amônio a 1%. Porém, executamos essa lavagem unicamente com água destilada, segundo TREADWELL (1950). Os resultados obtidos são idênticos aos conseguidos com o uso da solução de nitrato de amônio, desde que o fim da lavagem seja determinado pela ausência de acidez, o que se verifica numa parte do próprio filtrado.

A titulação do fosfomolibdato de amônio é feita com ácido sulfúrico. Entretanto, apenas em KOLTHOFF e SANDELL (1952) e FOULK (1952) encontramos referência à técnica de titulação colocando um excesso de ácido sulfúrico e voltando ao ponto de viragem com soda, a fim de se obter uma titulação com ponto mais definido.

Adotamos esta técnica em nossas determinações e verificamos serem os resultados obtidos mais precisos.

RESULTADOS OBTIDOS

Analizamos, pelo método descrito, alguns inseticidas fosforados, cujas amostras foram por nós requisitadas dos respectivos representantes.

Na tabela 1, estão esquematizados os resultados encontrados em diferentes amostras comerciais, com as respectivas repetições.

TABELA 1

Produto	1. ^a	2. ^a	Média
Diazinon — 40%	38,65%	37,97%	38,31%
Gusathion — 50%	51,95%	51,23%	51,59%
Dipterex — 50%	55,20%	55,03%	55,11%
Systox — 50%	53,39%	53,89%	53,64%
Metasystox — 50% ...	59,71%	59,71%	59,71%

As amostras de Dipterex, Systox e Metasystox, concentrados emulsionáveis, apresentavam-se mal homogeneizadas e com grumos em suspensão, o que provocou resultados um pouco elevados para êsses três produtos.

CARACTERÍSTICOS DE ALGUNS INSETICIDAS FOSFORADOS

Em virtude de não termos encontrado, na literatura disponível, referências sobre alguns dos novos inseticidas fosforados, conseguimos, através de FISCHER (1956) e de alguns dos laboratórios fabricantes, dados sobre os nomes químicos, fórmulas bruta e estrutural, de vários desses inseticidas.

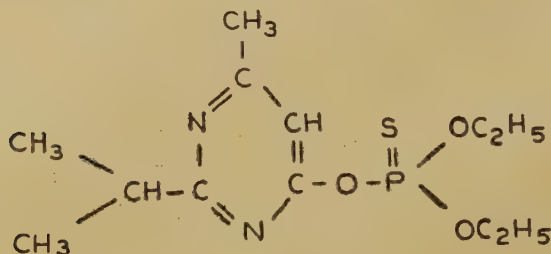
Com êstes dados calculamos, para cada um, o seu peso molecular, sua porcentagem em fósforo e o respectivo fator de conversão (Tabela 2).

TABELA 2

DIAZINON

Nome comercial	Diazinon
Nome químico	Tiofosfato de (0,0 — dietil — O-[2-isopropil-4-metil-pirimidil])
Peso molecular	303,97
% em fósforo	10,18%
Fórmula bruta	$C_{12}H_{21}O_3N_2SP$

Fórmula estrutural:

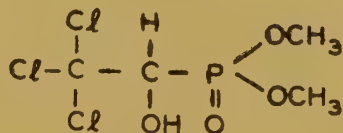


f. de conversão: % de fósforo orgânico total para Diazinon, 9,8121

DIPTEREX

Nome comercial	Dipterex, Tugon
Nome químico	Fosfonato de 0,0-dimetil-1-hidroxi-2,2,2 tricloroetila
Pêso molecular	257,47
% em fósforo	12,02%
Fórmula bruta	$C_4H_8O_4Cl_3P$

Fórmula estrutural:

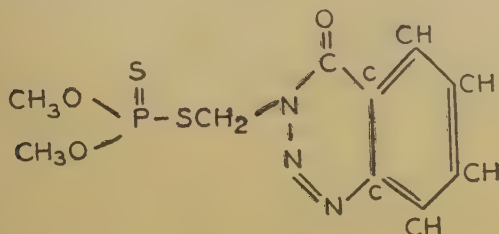


f. de conversão: % de fósforo orgânico total para Dipterex, 8,3135

GUSATHION

Nome comercial	Gusathion, Guthion
Nome químico	0,0-dimetil-S-(4-oxi-benzotriazina-3-metil) fósforo ditioato
Pêso molecular	316,97
% em fósforo	9,77%
Fórmula bruta	$C_{10}H_{12}O_2N_3S_2P$

Fórmula estrutural:

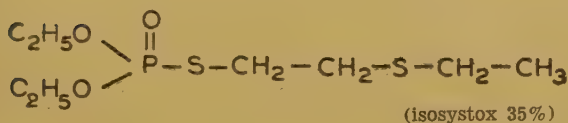
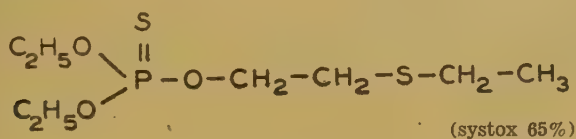


f. de conversão: % de fósforo orgânico total para Gusathion, 10,2347

SYSTOX

Nome comercial	Systox, E-1059
Nome químico	65% de 0,0-dietil-0-etil-mercaptoetil tiofosfato 35% de 0,0-dietil-S-etil mercaptoetil tiofosfato
Pêso molecular	257,97
% em fósforo	12,00%
Fórmula bruta	$C_8H_{19}O_3S_2P$

Fórmula estrutural:

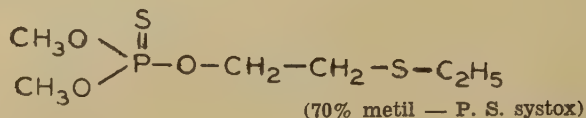


f. de conversão: % de fósforo orgânico total para Systox, 8,3296

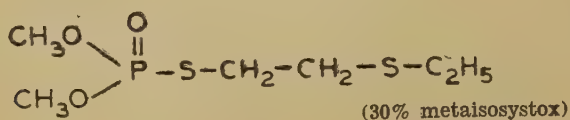
METASYSTOX

Nome comercial	Metasystox
Nome químico	70% de 0,0-dimetil-O-etil-mercaptoetil tiofosfato e 30% de 0,0-dimetil-S-etil mercaptoetil tiofosfato
Pêso molecular	229,97
% em fósforo	13,42%
Fórmula bruta	$C_6H_{15}O_3S_2P$

Fórmula estrutural:



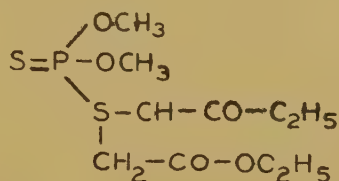
f. de conversão: % de fósforo orgânico total para Metasystox, 7,4255



MALATHION

Nome comercial	Malathion, Malatox
Nome químico	Ditiofosfato 0,0 dimetilico de S (etil-1,2-dicarboetoxi)
Pêso molecular	313,97
% em fósforo	9,86%
Fórmula bruta	$\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{O}_5\text{S}_2\text{P}$

Fórmula estrutural:

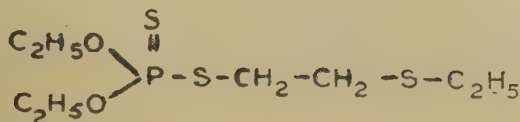


f. de conversão: % de fósforo orgânico total para Malathion, 10,1378

DISYSTON

Nome comercial	Disyston
Nome químico	0,0-dietil-S-2(tioetil)-éster etílico do ácido ditiofosfórico
Pêso molecular	273,97
% em fósforo	11,30%
Fórmula bruta	$\text{C}_8\text{H}_{19}\text{O}_2\text{S}_3\text{P}$

Fórmula estrutural:

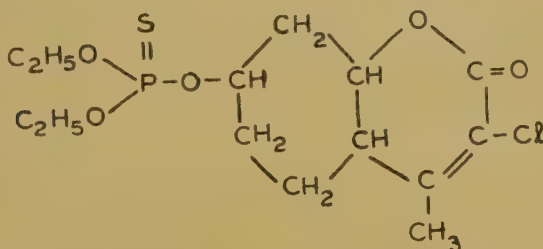


f. de conversão: % de fósforo orgânico total para Disyston, 8,8463

MUSCATOX

Nome comercial	Muscatox, Asuntol, Potosan
Nome químico	éster-3-cloro-4 metil-7 oxicumarina-0,0-dietiltiofos- fórico
Pêso molecular	368,42
% em fósforo	8,40%
Fórmula bruta	$\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_5\text{ClSP}$

Fórmula estrutural:

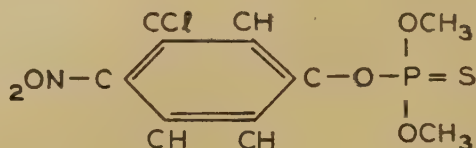


f. de conversão: % de fósforo orgânico total para Muscatox, 11,8960

CHLOROTION

Nome comercial	Chlorotion
Nome químico	0,0-dimetil-0,0(3-cloro-4 nitrofenil) tiofosfato
Pêso molecular	297,47
% em fósforo	10,41%
Fórmula bruta	$\text{C}_8\text{H}_9\text{O}_5\text{NClSP}$

Fórmula estrutural:

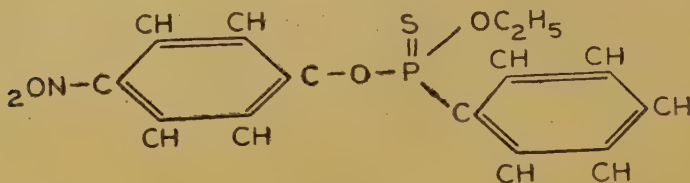


f. de conversão: % de fósforo orgânico total para Chlorotien, 9,6051

EPN

Nome comercial	EPN
Nome químico	0,etil-0-p-nitrofenil-benzeno-tiofosfato
Peso molecular	322,97
% em fósforo	9,58%
Fórmula bruta	$C_{14}H_{14}O_4NSP$

Fórmula estrutural:

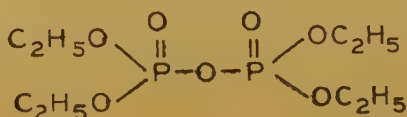


f. de conversão: % de fósforo orgânico total para EPN, 10,4284

TEPP

Nome comercial	TEPP
Nome químico	tetraetilpirofosfato
Peso molecular	289,94
% em fósforo	21,36%
Fórmula bruta	$C_8H_{20}O_7P_2$

Fórmula estrutural:

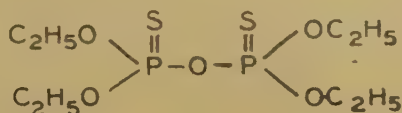


f. de conversão: % de fósforo orgânico total para TEPP, 4,6809

SULFOTEPP

Nome comercial	Sulfotepp
Nome químico	tetraetilditiofirofosfato
Pêso molecular	321,94
% em fósforo	19,23%
Fórmula bruta	$C_8H_{20}O_5S_2P_2$

Fórmula estrutural:

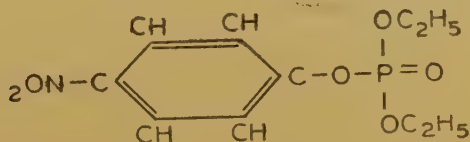


f. de conversão: % de fósforo orgânico total para Sulfotepp, 5,1976

PARA-OXON

Nome comercial	Para-Oxon
Nome químico	0,0 dietil-O-p-nitrofenilfosfato
Pêso molecular	274,97
% em fósforo	11,26%
Fórmula bruta	$C_{10}H_{14}O_6NP$

Fórmula estrutural:

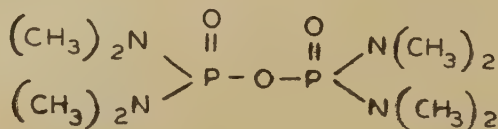


f. de conversão: % de fósforo orgânico total para Para-Oxon, 8,8785

OMPA

Nome comercial	Ompa, Schradan
Nome químico	Octametilpirofosforamida
Pêso molecular	285,94
% em fósforo	21,66%
Fórmula bruta	$C_8H_{24}N_4O_3P_2$

Fórmula estrutural:



f. de conversão: % de fósforo orgânico total para Ompa, 4,6164

SUMÁRIO

Embora os métodos baseados em reações específicas para dosagem dos inseticidas fosforados apresentem ótimos resultados, tornam-se, entretanto, de difícil execução num trabalho de rotina, porquanto, demandam muito tempo para sua execução.

Em vista disso a tendência dos autores foi a de convergir para um método geral a todos os fosforados e que apresentasse idênticos resultados. Para isso introduziram uma série de modificações no método do fosfomolibdato de amônio, usado na determinação do fósforo em compostos orgânicos.

Dêsse modo, um processo rápido e preciso é descrito com todos os detalhes de ordem técnica.

PHOSPHOROUS INSECTICIDES ANALYSIS

Abstract

Though the methods for the determination of phosphorous insecticides, based on specific reactions, give excellent results, they are of a time consuming nature which does not harmonize with a intensive routine work.

So, a universal method is described for the analysis of such organic compounds, which proved quite satisfactory. It resulted from modifications introduced into the original phosphomolybdate method applied to organic compounds.

BIBLIOGRAFIA

- KOLTHOFF, I. M. & SANDELL, E. B. — 1952 — Textbook of Quantitative Inorganic Analysis. The MacMillon Company. N. York — pág. 674.
- FOULK, C. W., MOYER, H. V. & MAC NEVIN, W. M. — 1952 — Quantitative Chemical Analysis. McGraw — Hill Book Co., Inc. N. York — pág. 338.
- GUNTHER, F. A. & BLINN, R. C. — 1955 — Analysis of Insecticides and Acaricides. Interscience Publishers, Inc. N. York — pág. 538.
- FREAR, D. E. H. — 1955 — Chemistry of the Pesticides. D. Van Nostrand Inc. N. York — pág. 73.
- SOUZA, D. A. & ALMEIDA, N. F. — 1957 — Métodos de Análise Química de Inseticidas e Fungicidas. Edição do Fundo de Pesquisas do Instituto Biológico — pág. 47.
- TREADWELL — 1950 — Tratado de Química Analítica, tomo 2. Manuel Marin, Editor. Buenos Ayres — pág. 384.
- World Health Organization — 1956 — Specifications for Pesticides — pág. 84.
- FISCHER, C. D. — 1956 — Pesticides, Past, Present and Prospects. Chemical Week. October, 27 — pág. 59.

EXPERIÊNCIAS PARA COMBATE À *THECLA BASILIDES*
(GEYER, 1837), BROCA DO ABACAXI (*LEPID. LYCAENIDAE*) (*)

POR

W. O. Heinrich
Do Instituto Biológico de São Paulo

Com 2 tabelas no texto

INTRODUÇÃO

De acôrdo com a literatura compulsada, desde 1912 os abacaxizais do Estado de São Paulo tinham a produção prejudicada pela lagarta de uma borboleta que BONDAR (1) classificou como *Hypolycaena phillipus*.

Espécimes coletados posteriormente por técnicos do Instituto Biológico de São Paulo foram identificados como *Thecla echion* (L., 1758).

Em 1947, adultos obtidos de lagartas colhidas em abacaxis foram enviados a P. W. GOODSON, entomologista do Rothschild Museum, dependência do British Museum, que classificou todos os exemplares como *Thecla basilides* (GEYER, 1837). Em virtude de, após o exame de muitos abacaxizais nas zonas de cultura, nunca termos colhido exemplares de *T. echion* e também, em vista de não mais ter sido constatada a espécie *Hypolycaena phillipus* no Brasil, supomos ter havido engano nas duas classificações precedentes.

A biologia dessa praga foi estudada em 1927 por W. H. HARRIS (4), em Trinidad, onde se observaram danos idênticos aos constatados em São Paulo, tendo o mesmo técnico estudado, também, o efeito, possivelmente repelente, de calda bordaleza no seu combate. No Brasil, J. P. FONSECA (3) sugeriu a aplicação de inseticidas à base de arsenicais ou de nicotina. Em TRINIDAD (8), foi investigada a ação de produtos à base de rotenona, porém os resultados não foram conclusivos.

IMPORTÂNCIA DA PRAGA

A lagarta da *Thecla basilides* tem invalidado os esforços para o estabelecimento definitivo das lavouras de abacaxi em determinadas

(*) Recebido para publicação em 12 de setembro de 1958.

zonas do Estado, sendo, ao lado do *Pseudococcus brevipes* (CKLL.), o seu maior inimigo. Como tal causou a completa ruína dos abacaxiais em Boituva, município paulista que tradicionalmente os cultivava. A produção, que ultrapassava 6 milhões de frutos em 1942, caiu para 50 mil em 1947, devido principalmente ao ataque dessa praga (5). Os municípios circunvizinhos se ressentiram também de vultosos prejuízos.

Por serem tão importantes as perdas causadas por essa espécie, o autor resolveu investigar os processos de combate por meios químicos, os quais constituem o objeto do presente trabalho.

No decorrer das experiências foi coletado e criado pelo autor, em laboratório, um novo parasita da *T. basilides*, o qual foi identificado por Costa Lima (6) como *Zygosturmia Heinrichi* COSTA LIMA, 1947.

EXPERIÊNCIA REALIZADA EM 1946-1947

Em outubro de 1946 localizou-se num abacaxizal um talhão com 55 parcelas, dispostas em 5 blocos, correspondentes respectivamente a 11 tratamentos com 5 repetições; a distribuição das parcelas foi feita ao acaso dentro de cada bloco e os tratamentos se processavam apenas uma vez. Cada parcela tinha a largura equivalente a 3 fileiras de plantas e 14,00 m de comprimento. Como as fileiras distavam entre si de 1,30 m, cada parcela media então 36,40 m² ou 1/664 de alqueire paulista. Cada parcela era marginada, lateralmente, por 3 fileiras de plantas e, nas extremidades, por um intervalo de 5 metros, também com abacaxizeiros. Todas as plantas circundantes de cada parcela não sofreram tratamento no decurso da experiência.

INSETICIDAS E MODO DE APLICAÇÃO

Os inseticidas usados, as dosagens, assim como as quantidades empregadas, já calculadas para a unidade alqueire paulista (24.200 m²), são mencionados adiante. Foram efetuadas 5 pulverizações, com intervalo de trinta dias, a partir do dia 27 de novembro.

Os tratamentos praticados com um pulverizador de 13 l eram iniciados pela manhã e prosseguiram até que todos estivessem concluídos, tendo-se tido o cuidado de anotar para todas as parcelas as quantidades utilizadas dos inseticidas correspondentes.

As aplicações dos inseticidas abrangeram sempre todas as plantas de cada parcela, mesmo as que ainda não possuíam frutos.

Essa circunstância determinou um aumento considerável na quantidade de líquido usado. As quantidades discriminadas abaixo referem-se ao gasto por alqueire, no caso de pulverização proporcional ao gasto da experiência.

A — Sulfato de nicotina a 0,15% (0,06% de nicotina básica) diluído em calda bordaleza a 1% — 1.832 litros.

B — Sulfato de nicotina a 0,15% (0,06% de nicotina básica) — 1.879 litros.

C — Sulfato de nicotina a 0,15% (0,06% de nicotina básica) + 1% de sabão de cinza — 1.987 litros.

D — Arseniato de chumbo a 0,40% (0,12% de anidrido arsenico básico) — 1.765 litros.

E — Arseniato de chumbo a 0,40% (0,12% de anidrido arsenico básico) + 0,40% de óleo de linhaça + 2% de leite — 1.827 litros.

F — DDT básico a 0,05% — 1.887 litros.

G — DDT básico a 0,10% — 1.873 litros.

H — Fluo-aluminato de sódio básico a 0,9% — 1.946 litros.

I — Albolineum a 1% (0,1% de óleo miscível) — 1.816 litros.

J — Dinitro-ciclo-hexil-fenol a 0,1% — 1.871 litros.

K — Testemunha sem tratamento.

Cada uma dessas fórmulas corresponde, na tabela 1 e no gráfico 1, aos canteiros marcados com a letra que precede a discriminação acima.

RESULTADOS — Pouco tempo depois do último tratamento, começou a colheita que se efetuou à medida que os frutos amadureciam. Foram feitos, dessa forma, quatro cortes. Cada abacaxi colhido era cuidadosamente examinado e desde que apresentasse sinais do ataque pela broca, resinose abundante ou excrementos frescos da lagarta, à entrada do orifício de penetração, era tido como prejudicado. Os dados apurados em cada parcela, transformados em porcentagens de frutos sãos, encontram-se na tabela 1, indicando-se abaixo desta as diferenças mínimas significativas para os índices fiduciais de 5% e de 1%.

TABELA 1

Resumo dos resultados obtidos na 1.^a experiência transformados na média de suas porcentagens e ordenados na razão decrescente de sua eficiência

Tratamentos	Porcentagem de princípio ativo	Porcentagem média de frutos sãos
E — Arseniato de chumbo + óleo de linhaça + leite	0,40-0,40-2,0	77,4
C — Sulfato de nicotina + sabão de cinza	0,15-1,0	74,8
G — DDT básico	0,10	71,5
F — DDT básico	0,05	70,6
B — Sulfato de nicotina	0,15	70,4
I — Alboléum	1,00	69,1
J — Dinitro-ciclo-hexil-fenol	0,10	69,0
D — Arseniato de chumbo	0,40	67,8
H — Fluo-aluminato de sódio	0,90	66,8
A — Sulfato de nicotina + calda bordaleza	0,15-1,0	66,5
K — Testemunha	—	50,5
	5%	8,6412
Diferença mínima significativa	1%	11,5615

EXPERIÊNCIAS REALIZADAS EM 1947-1948

Em parte de um talhão uniforme de abacaxizeiros, localizaram-se, em novembro de 1947, 32 parcelas dispostas em um esquema de blocos ao acaso. Cada parcela tinha a largura equivalente a 4 fileiras de plantas e o comprimento de 10,00 m. Sendo as fileiras separadas por uma rua de 1,30 m, cada parcela media 39,00 m² de superfície, ou seja 1/620 de alqueire paulista. Cada parcela era marginada lateralmente por 3 fileiras de plantas e nas extremidades por um intervalo de 2,5 m também com abacaxizeiros. Todas as plantas que circundavam cada parcela não sofreram tratamento no decurso

da experiência. Dentro das parcelas foram distribuídos ao acaso 8 tratamentos, incluindo o tratamento testemunha como um deles. A cada tratamento correspondiam 4 repetições. Dentro de cada parcela foram escolhidas 37 plantas cujas inflorescências começavam a abrir e não apresentavam sinais de ataque pela lagarta. Essas plantas foram marcadas e seus frutos constituíram o material verificado por ocasião da colheita. Deve-se observar que todas as plantas de cada parcela eram tratadas, mesmo as que não seriam objeto de contagem.

Foram efetuadas seis pulverizações com intervalos de 15 dias entre cada uma e a subsequente. Esse intervalo apenas foi alterado entre a 3.^a e a 4.^a aplicação por motivo de chuva ininterrupta por três dias. As datas de aplicação foram as seguintes: 4 de novembro; 19 de novembro; 4 de dezembro; 23 de dezembro; 7 de janeiro e 22 de janeiro. Observaram-se as seguintes fórmulas e quantidades por alqueire, proporcionais às gastas na experiência:

- A — DDT básico a 0,50% — 1.959 litros.
- B — DDT básico a 0,25% — 1.730 litros.
- C — Tiofosfato de dietil-paranitrofenil básico a 0,005% — 1.836 litros.
- D — Tiofosfato de dietil-paranitrofenil básico a 0,010% — 1.880 litros.
- E — Arseniato de chumbo a 0,40% (0,12% de anidrido arsênico básico) + óleo de linhaça a 0,40% + 2% de leite — 1.830 litros.
- F — Arseniato de cálcio a 0,40% (óxido de cálcio básico a 0,16%) + óleo de linhaça a 0,40% + 2% de leite — 1.881 litros.
- G — Tobacine a 0,1% (DDT básico a 0,025% + Metilnaftaleno a 0,028% + quantidade indeterminada de nicotina e hidrocarbonetos) — 1.872 litros.
- H — Testemunha sem tratamento.

O Tiofosfato de dietil-paranitrofenil foi preparado em laboratório a 5%, e empregando-se acetona, álcool e ricinoleato de sódio como elementos de fixação.

TOMADAS DE AMOSTRAS — Após a última aplicação e à medida que os abacaxis iam amadurecendo, eram colhidos. Na colheita verificou-se o estrago causado pela *Thecla basilides* nos frutos prévia-

TABELA 2

Resumo dos resultados obtidos na 2.^a experiência transformados nas médias angulares de suas porcentagens e ordenados na razão decrescente de sua eficiência

Tratamentos	Porcentagem de princípio ativo	Porcentagem média de frutos sãos	Média Angular
G — DDT + Metilnaftalenos + Composto de tabaco	0,025 + 0,028 + indetermin.	85,12	67,3500
C — Tiofosfato de dietil-paranitrofenil básico	0,005	80,43	63,8250
D — Tiofosfato de dietil-paranitrofenil básico	0,010	79,08	63,4500
A — DDT básico	0,50	66,25	54,5250
E — Arseniato de chumbo + óleo de linhaça + leite	0,40 — 0,40 — 2,00	64,90	53,7500
F — Arseniato de cálcio + óleo de linhaça + leite	0,40 — 0,40 — 2,00	60,85	51,3250
B — DDT básico	0,25	60,18	50,9000
H — Testemunha	—	40,38	39,3750
Diferença mínima significativa		5% 1%	6,0139 8,1853

mente marcados, divididos em sãos e atacados, da mesma forma que na experiência precedente.

Foram efetuados 11 cortes de abacaxis nas seguintes datas: 3, 11, 13 e 17 de fevereiro; 2, 17, 23, 30 de março; 7, 14, 20 e 27 de abril. O amadurecimento dos frutos foi uniforme em tôdas as parcelas, pelo cuidado que se tomara previamente, de marcar frutos no mesmo estágio de desenvolvimento.

RESULTADOS — Os resultados são apresentados em porcentagens de frutos sãos, na tabela 2. Para se proceder a análise de variância da experiência transformaram-se êstes dados nos ângulos das porcentagens.

Na parte inferior da tabela 2 estão mencionadas as diferenças mínimas significativas para os índices fiduciais de 5% e de 1%.

DISCUSSÃO

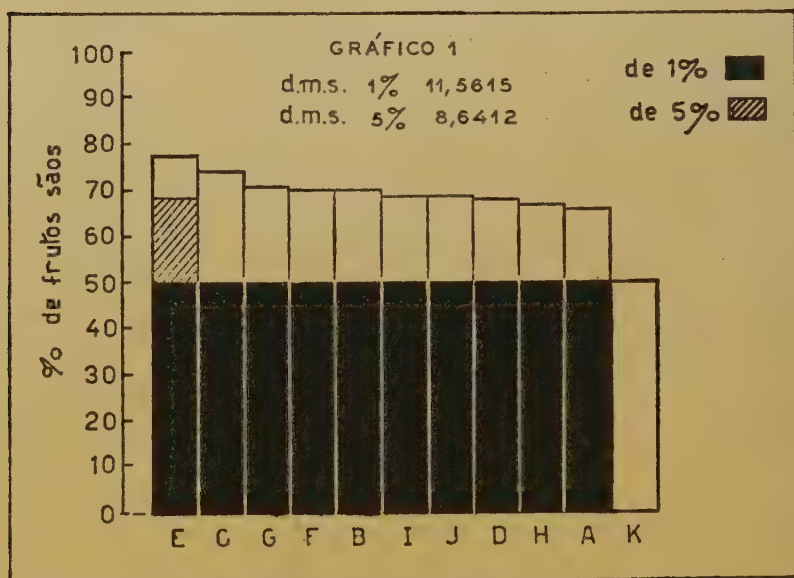
A análise estatística dos dados contidos na tabela 1 revela que o resultado dos tratamentos foi altamente significativo para todos os tratamentos em relação à testemunha. Entre êles houve apenas significância estatística no nível fiducial de 5%, entre o tratamento E (primeiro colocado), e os que se colocaram em último lugar: tratamentos D, H e A. Para isso concorreram dois fatores: 1.º — quando se iniciou a experiência em novembro de 1946 já havia frutos brocados no abacaxizal; 2.º — o espaçamento de um mês entre dois tratamentos consecutivos não permitiu que a proteção se mantivesse por todo o período da experiência. Deve-se observar que o período de outubro a março é o de maior pluviosidade para a zona em que se trabalhou (5). Não julgamos por êstes motivos os resultados da primeira experiência bastante conclusivos para basearmos a sua análise estatística na transformação das porcentagens conseguidas, em raiz quadrada do arco seno. Êstes resultados estão indicados no gráfico 1 — em porcentagens de frutos sãos.

Em a experiência de 1947-1948 êstes inconvenientes foram afastados pela marcação dos frutos que se destinavam à contagem e que foram escolhidos unicamente entre os que ainda não estavam atacados na época. Diminuiu-se o intervalo de tempo entre os tratamentos e o número de pulverizações foi elevado para seis. Em consequência disso os resultados das parcelas de cada tratamento apresentaram maior homogeneidade do que os da primeira experiência. Para eliminar o efeito de porcentagens extremas fêz-se a transformação citada acima.

O planejamento e análise destas experiências basearam-se nos trabalhos de SNEDECOR (7) e COCHRANE (2).

CONCLUSÕES

A análise estatística dos dados contidos na tabela 2 revela a existência dentro das fórmulas empregadas de dois grupos mais ou



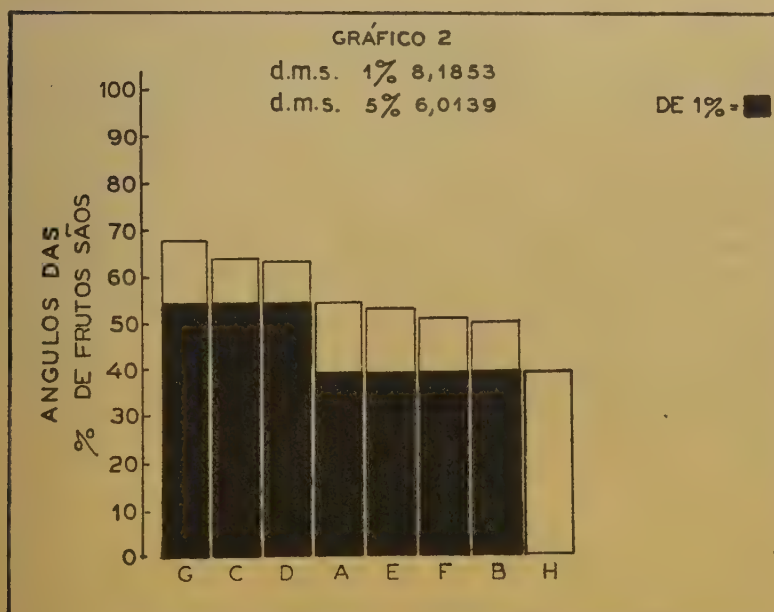
O gráfico acima indica que todas as formulações empregadas foram superiores por diferenças altamente significativas (côr preta), à testemunha K; e ainda que o tratamento G foi superior por diferença apenas significativa (índice fiducial de 5%), aos tratamentos D, H e A, cujo índice de eficiência, (tôpo de suas colunas), está situado abaixo do tôpo do segmento achuriado da coluna E.

menos bem delimitados. Estes resultados são apresentados no Gráfico 2.

O primeiro grupo, que alcançou melhores resultados, constitui-se do Tobacine a 0,1% e do Tiofosfato de dietil-paranitrofenil a 0,005% e a 0,010%. Entre essas três fórmulas não houve diferenças

significativas, porém tôdas elas são altamente significativas em relação aos outros tratamentos e à testemunha.

O segundo grupo constitue-se do DDT a 0,50% e a 0,25%; do arseniato de chumbo a 0,40% e do arseniato de cálcio também a 0,40% adicionados ambos de adesivos (óleo de linhaça a 0,40% e leite a 2%). Todos são superiores, por diferença altamente significativa, à testemunha e são inferiores, também por diferença alta-



O gráfico acima indica que todos os tratamentos foram superiores por diferença altamente significativa (côr preta), ao nível da testemunha H. Indica ainda que os tratamentos G, C e D foram superiores também por diferença altamente significante aos tratamentos A, E, F e B.

mente significativa, às formulações do primeiro grupo. As formulações do segundo grupo também não apresentam, entre si, diferenças significativas.

EXPERIMENTS FOR THE CONTROL OF THE PINEAPPLE BORER
THECLA BASILIDES (GEYER, 1837) (LEPID., LYCAENIDAE)

Abstract

*This paper refers to the researches conducted between 1946 and 1948 to ascertain an effective control of caterpillar of *Thecla basilides* (Geyer, 1837), one of the most serious pests of pineapple plantations in Brazil.*

Two field tests were conducted at Tatui, State of São Paulo, with randomized block design. In the first experiment ten spray combinations were tested all of them giving excellent results as compared with untreated plots. The differences between the combinations were not convincing. So another set of experiments, in a total of seven spray combinations, was planned and carried out. Fruits not damaged, marked at the beginning of the second trial, were picked and examined at the harvest time. The statistical analysis revealed that three of the combinations were better than the others, at the fiducial level of 1%. These combinations were: 1) 0.1 percent Tobacine (a commercial product containing 25 percent DDT, 28 percent Methylnaphthalenes and 12 percent of other hydrocarbons); 2) 0.005 percent Parathion and 3) 0.010 percent Parathion. The other four combinations were planned with DDT and arsenicals sprays.

All of the treatments afforded good protection.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — BONDAR, G. — 1912 — Uma praga do abacaxí. *Bol. Min. Agr.*, Rio de Janeiro, 1 (4): 103-104.
- 2 — COCHRANE, W. G. — 1938 — Some difficulties in the statistical analysis of replicated experiments. *Emp. J. Exp. Agric.*, 6: 157-175.
- 3 — FONSECA, J. P. — 1927 — A lagarta do abacaxí. *O Biológico*, S. Paulo, 3 (1): 21-22.
- 4 — HARRIS, W. V. — 1927 — On a Lycaenid Butterfly attacking pineapples in Trinidad, B. W. I. *Bull. Ent. Res.*, Londres, 18: 183-188.

- 5 — HEINRICH, W. O. — 1947 — Resinose do fruto do abacaxi. *O Biológico*, S. Paulo, **13** (7): 119-122.
- 6 — LIMA, A. DA COSTA — 1947 — Sôbre endoparasitos da *Thecla basilides* (Lep. Lycaenidae). *An. Acad. Bras. Ciências*, Rio de Janeiro, **19** (3): 277-281.
- 7 — SNEDECOR, GEORGE W. — 1946 — Statistical methods applied to experiments in agriculture and biology. The Iowa State College Press. Ames, Iowa.
- 8 — THOROLD, C. A. — 1940 — Control of pineapple caterpillar. *Trop. Agric.*, Londres, **17** (11): 215-216.

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA CUTÂNEA NO DESENVOLVIMENTO DE LESÕES LEISHMANIÓTICAS (*)

POR

C. Pereira, M. P. de Castro & D. de Mello

Do Instituto Biológico de São Paulo

Com 7 tabelas e estampas 8-9-10

INTRODUÇÃO

A leishmaníase cutânea da cobaia (2, 5), por *Leishmania enriettii* MUNIZ & MEDINA, 1948, se caracteriza pela formação de lesão primária, a princípio como botão fechado que depois se ulcera, e pelo aparecimento posterior de lesões metastáticas nas extremidades do corpo. As lesões metastáticas, provocadas pela instalação e multiplicação de parasitas trazidos pela corrente sanguínea (7), se formam nas orelhas, focinho, patas, pálpebra, genitália e raramente na mucosa nasal (4). É possível encontrar leishmânias em outras regiões, mesmo em órgãos internos, mas nunca o desenvolvimento da lesão típica (4, 5, 6, 7). As partes onde podem ocorrer metástases são justamente as que apresentam as temperaturas cutâneas mais baixas do corpo. Estes fatos e ainda nossa observação, por cerca de dez anos, de que os casos de curas espontâneas coincidem, frequentemente, com temporadas de intenso calor, nos levaram a pensar ser a temperatura cutânea um dos fatores exigidos para o desenvolvimento da lesão leishmaniótica. Neste trabalho apresentamos os resultados obtidos pela experimentação levada a efeito com o fim de elucidar este ponto.

MATERIAL

Suspensão de leishmânias tissulares obtidas de lesões fechadas, cujo número de leishmânias foi determinado por contagem em hematómetro, e tratadas com 200 U. O. de Penicilina e 200 mcg. de Estreptomicina por ml.

(*) Recebido para publicação em 15 de dezembro de 1958.

MÉTODO

PRIMEIRO EXPERIMENTO: Usamos cinco grupos de oito cobaias para inoculação por via subcutânea no focinho, orelha, dorso (com pêlo cortado rente), ventre e por via intraperitoneal.

Foram inoculadas 40 milhões de leishmânias por via subcutânea e 165 milhões por via intraperitoneal. Antes da inoculação foram tomadas as temperaturas dos locais escolhidos com termômetro cutâneo magnético. Em seguida à inoculação tôdas as quarenta cobaias foram colocadas em câmara com temperatura constante de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, e examinadas freqüentemente para observação do desenvolvimento das lesões.

SEGUNDO EXPERIMENTO: Tomaram-se seis cobaias que sobreviveram ao período de 159 dias do primeiro experimento, escolheram-se quatro das que apresentavam lesões mais extensas, as quais foram colocadas em estufa a 37°C ; as duas restantes foram deixadas a 25°C .

TERCEIRO EXPERIMENTO: Para comprovar os resultados obtidos na segunda experiência, inoculamos dez cobaias de 250 a 300 g com 35 milhões de leishmânias, no tecido subcutâneo do focinho. Depois da inoculação tôdas as dez cobaias ficaram durante 48 horas a temperatura de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$., para assegurar boas condições iniciais, e em seguida foram separadas em dois grupos de igual número. Um dêles foi colocado em estufa a 38°C e outro deixado na câmara a temperatura de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Tomaram-se as temperaturas cutâneas do focinho e orelhas das cobaias dos dois grupos, antes e depois do tratamento diferente.

RESULTADOS

PRIMEIRO EXPERIMENTO: Influência do local de inoculação no desenvolvimento de lesões primárias e metastáticas.

1 — Inoculação no tecido subcutâneo do ventre com pêlos cortados rente. Temperatura cutânea média $37,08^{\circ}\text{C}$ (Tab. I).

Em cinco cobaias dêste grupo, apareceu botão muito pequeno no ponto de inoculação, entre o 10.^o e 15.^o dia depois da inoculação, que logo começou a regredir, de forma que, entre o 30.^o dia e o 59.^o dia tôdas as cobaias eram negativas para lesão primária.

Das três cobaias que não apresentaram, dêste o início, reação local, sòmente uma apresentou lesões metastáticas, nas extremidades, que progrediram até a morte do animal. Em três das cinco que, de

início, apresentaram reação local, surgiram posteriormente lesões metastáticas. Dêste experimento, no 159.^o dia, haviam sobrevivido quatro cobaias, duas normais e duas (ns. 5 e 6) com metástases, que foram aproveitadas no segundo experimento.

2 — Inoculação no tecido subcutâneo do focinho. Temperatura cutânea média 27,69° C (Tab. II).

As oito cobaias inoculadas apresentaram formação de botão, palpável desde o 9.^o dia depois da inoculação, que progrediu rapidamente levando à morte tôdas as cobaias antes de 48 dias. Sòmente três apresentaram metástases.

3 — Inoculação no tecido subcutâneo do dorso, com pêlos cortados rente. Temperatura cutânea média 35,25° C (Tab. III).

As oito cobaias inoculadas desenvolveram lesões no ponto de inoculação, mas com certo retardo: os botões eram palpáveis a partir do 13.^o dia. Em sete a generalização se deu em 30 dias, em uma, em 69 dias. A cobaia com metastases mais tardias apresentou, no 117.^o dia depois da inoculação, sinais de regressão da lesão primária, no 159.^o dia iniciou a regressão das lesões metastáticas e no 186.^o dia estava perfeitamente normal (cobaia n.^o 8 Tab. III). Além desta, três sobreviveram, apesar da extensão das lesões, e foram usadas no segundo experimento.

4 — Inoculação na orelha. Temperatura cutânea média 26,5° C (Tab. IV).

No 9.^o dia depois da inoculação, as oito cobaias inoculadas apresentaram botão que progrediu rapidamente, tomando quase tôda a orelha. A partir do 24.^o dia tôdas apresentaram metástases. Sòmente uma sobreviveu ao 159.^o dia, apresentando depois sinais de regressão de algumas lesões, mas houve recrudescimento após alguns dias (cobaia n.^o 1, Tab. IV).

5 — Inoculação intraperitoneal (Tab. V). Uma das cobaias inoculadas morreu três dias depois, não entrando, por isso, na análise dos resultados. Em nenhuma das sete restantes se desenvolveu lesão no ponto de introdução da agulha, mas, 20 dias depois em tôdas apareceram as primeiras lesões de generalização, que aumentaram até a morte de tôdas as cobaias que ocorreu entre o 42.^o e 150.^o dia.

SEGUNDO EXPERIMENTO: Influência da temperatura na regressão das lesões metastáticas (Tab. VI).

Em uma das sete cobaias (n.^o 8, Tab. III) sobreviventes do primeiro experimento, tôdas as lesões regrediram; mesmo continuan-

TABELA I

INOCULAÇÃO VENTRE [Temp. média local = 37,08°C] — 16/6

Cobala	Data	Focinho	Pálpebras	Genitália	Lábios	Orelhas		Patas anteriores		Patas Posteriores		Ventre	Dorso
						Direita	Esquerda	Direita	Esquerda	Direita	Esquerda		
1	26/6 30/6 4/10 26/11	— — — —	— — — normal até 17/1	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —
2	26/6 17/7 4/10 26/11	— — — —	— — — normal até 17/1	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —
3	26/6 4/10 13/10 26/11	— — — —	— — — normal até 17/1	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —
4	26/6 21/7 24/7 4/8 6/8	— — — — —	— — — — normal até 17/1	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —
5	26/6 30/6 1/8 25/8 10/9 16/9 23/9 4/10 12/10 26/11	— — — — — — — — — —	— — — — — — — — — morreu em 6/8	— — — — — — — — — —	— — — — — — — — — —	— — — — — — — — — —	— — — — — — — — — —	— — — — — — — — — —	— — — — — — — — — —	— — — — — — — — — —	— — — — — — — — — —	— — — — — — — — — —	— — — — — — — — — —

usada no experimento n.º 2

TABELA I (continuação)

[illegible]

TABELA III

INOCULAÇÃO DORSO [Temp. média local = 35,25°C] — 16/6

Cobala	Data	Focinho	Pálpebras	Genitália	Lábios	Orelhas		Patas Anteriores		Patas Posteriores		Ventre	Dorso
						Direita	Esquerda	Direita	Esquerda	Direita	Esquerda		
1	26/6 21/7 28/8 23/9 13/11 26/11	— — — — — + + + + + usada no experimento n.º 2	— — — — — + + + + + usada no experimento n.º 2	— — — — — + + + + + usada no experimento n.º 2	— + + + + — — — — — — — — — — —	— — — — — + — — — — — — — — —	— — — — — — — — — — — — — — —	— — — — — + + + + + — — — — —	— — — — — + + + + + — — — — —	— — — — — + + + + + — — — — —	— — — — — + + + + + — — — — —	— — — — — + + + + + — — — — —	— +
2	26/6 30/6 28/7 23/9 15/10	— — — — — + + + + + morreu em 15/10	— — — — — + + + + + morreu em 15/10	— — — — — + + + + + morreu em 15/10	— — — — — — — — — — — — — — —	— — — — — — — — — — — — — — —	— — — — — — — — — — — — — — —	— — — — — + + + + + — — — — —	— — — — — + + + + + — — — — —	— — — — — + + + + + — — — — —	— — — — — + + + + + — — — — —	— — — — — + + + + + — — — — —	— +
3	26/6 18/7 8/8 14/8 15/9 4/10 25/11	— — — — — + + + + + usada no experimento n.º 2	— — — — — + + + + + usada no experimento n.º 2	— — — — — + + + + + usada no experimento n.º 2	— — — — — — — — — — — — — — —	— — — — — — — — — — — — — — —	— — — — — — — — — — — — — — —	— — — — — + + + + + — — — — —	— — — — — + + + + + — — — — —	— — — — — + + + + + — — — — —	— — — — — + + + + + — — — — —	— — — — — + + + + + — — — — —	— +
4	26/6 24/7 8/8 13/8	— — — — — + + + + + morreu em 13/8	— — — — — + + + + + morreu em 13/8	— — — — — + + + + + morreu em 13/8	— — — — — — — — — — — — — — —	— — — — — — — — — — — — — — —	— — — — — — — — — — — — — — —	— — — — — + + + + + — — — — —	— — — — — + + + + + — — — — —	— — — — — + + + + + — — — — —	— — — — — + + + + + — — — — —	— — — — — + + + + + — — — — —	— +

TABELA III (continuação)

[illegible]

TABELA V

[illegible]

do até o 186.^o dia a temperatura ambiente de $25 \pm 1^{\circ} \text{C}$, não recrudesceram.

As seis restantes apresentavam, porém, lesões extensas no 159.^o dia. Destas foram escolhidas quatro, que se colocaram em temperatura ambiente de 38°C ; as duas outras foram deixadas a $25 \pm 1^{\circ} \text{C}$.

TABELA VI

Ambiente	Cobaia	N. ^o Anterior	Lesões	
			Iniciais	Finais
$25 \pm 1^{\circ} \text{C}$	1	Orelha 1 (Tab. IV)	Focinho 3 patas genitália orelha direita	Focinho 4 patas genitália orelha direita
	2	Dorso 3 (Tab. III)	Focinho 4 patas genitália orelha direita	Focinho 4 patas genitália orelha direita
	3	Dorso 6 (Tab. III)	Focinho 4 patas 2 orelhas pálpebra genitália	negativo negativas negativas negativa negativa
38°C	4	Dorso 1 (Tab. III)	Focinho 4 patas orelha direita genitália	negativo negativas negativa negativa
	5	Ventre 5 (Tab. I)	4 patas genitália	negativas negativa
	6	Ventre 6 (Tab. I)	focinho genitália	negativo negativa

Depois de 38 dias, estas duas cobaias apresentavam suas lesões aumentadas (Est. 8), ao passo que nas outras quatro tôdas as lesões haviam regredido e cicatrizado (Est. 9). Na fig. 6 (Est. 9) pode-se ver a cicatriz do focinho e o início de formação de nova pelagem; na fig. 4, da mesma estampa, a orelha normalizada, mas com as bordas recortadas por perda de substância por necrose de tecidos.

TERCEIRO EXPERIMENTO: Influência da temperatura no desenvolvimento da lesão primária (Tab. VII).

TABELA VII

	Cobaias	Ambiente	Ponto de inoculação	Lesão primária		
				8.º dia	15.º dia	30.º dia
1.º grupo	1	38º C	37º C	—	—	—
	2			—	—	—
	3			—	—	—
	4			—	—	—
	5			—	—	—
2.º grupo	6	26± 1º C	33,2º C	+	+	+
	7			+	+	+
	8			+	+	+
	9			+	+	morta
	10			±	+	+

A fim de se afastar a possibilidade da influência de outros fatores, como por exemplo o desenvolvimento de imunidade, na cicatrização das lesões das cobaias mantidas em estufa a 38º C, inoculamos mais dez cobaias de peso entre 250 e 300 g. com 35 milhões de leishmânias, subcutâneamente, no focinho.

As dez cobaias, depois de inoculadas, foram colocadas em ambiente a 26± 1º C durante 48 horas, para assegurar a péga. Em seguida foram separadas em dois grupos de cinco, o primeiro colocado a 26± 1º C e o segundo a 38º C. Depois de 8 dias, tôdas as cobaias do primeiro grupo apresentavam botão palpável, não encontrado em nenhuma do segundo grupo. A cobáia n.º 5 morreu no 7.º dia. No 15.º dia foram fotografadas as cobaias dos dois grupos (figs. ns. 7 e 8) e já notava-se sem palpação a diferença existente entre os dois grupos. No 30.º dia as cobaias mantidas a 38º C continuavam normais (fig. 9) e tôdas as mantidas a temperatura ambiente mais baixa já apresentavam ulceração no botão leishmaniótico (fig. 10).

A partir do 3.º dia, as cobaias do primeiro grupo foram colocadas em temperatura ambiente de 26± 1º C, para se verificar se houve destruição de tôdas as leishmânias inoculadas; oito dias depois apresentavam-se ainda normais; quinze dias depois, em uma cobáia se observou a formação de botão leishmaniótico, ao passo que as restantes eram perfeitamente normais.

CONCLUSÕES

Do primeiro experimento (Tab. I-V) podemos concluir que os melhores pontos de inoculação subcutânea para obtenção de lesões primárias são aqueles em que, normalmente, ocorrem metástases, isto é, aqueles cuja temperatura está bem abaixo de 36° C. A obtenção de lesão primária no dorso, onde normalmente não aparece metástase, só foi possível mantendo o pêlo cortado rente à pele, o que facilita a perda de calor. Na região ventral, onde a temperatura média é superior a 36° C, as lesões primárias não se desenvolvem, e só em algumas cobaias apareceram lesões metastáticas provocadas por parasitas que foram prontamente carregados pela corrente circulatória e tiveram, assim, oportunidade de encontrar condições ótimas para sua multiplicação. A via intraperitoneal é ótima para a generalização precoce da infecção, porque, provavelmente, apesar da alta temperatura interna, a disseminação é tão rápida que não há tempo para a destruição térmica de todas as leishmânias inoculadas. A inoculação no tecido subcutâneo do focinho, ótima para obtenção de lesão primária, não o é, contudo, para a observação do aparecimento de metástases. Os animais inoculados geralmente morrem logo, seja porque o tamanho da lesão dificulta a respiração e a alimentação, seja porque sobrevêm infecções secundárias.

Os resultados obtidos por BAKER & BALLESTEROS (1) e por nós no segundo e terceiro experimentos descritos neste trabalho, demonstram que a temperatura tem papel importante na evolução de lesões leishmânicas. Pelos resultados obtidos no primeiro experimento poder-se-ia pensar que, além da temperatura, outros fatores, por exemplo, tissulares, poderiam influir no desenvolvimento de lesões nas extremidades do animal. Mas se, colocando cobaias em temperatura ambiente de 38° C (Tab. VII), observamos que a subida da temperatura das extremidades coincide com a regressão de lesões já formadas (Exp. 2) ou com o impedimento de formação de lesões (Exp. 3), podemos concluir que a temperatura é, pelo menos, um dos fatores causais. A possibilidade de obtenção de úlceras no dorso, desde que se mantenha sem pêlos, exclui a hipótese do fator tissular. Em uma das 7 cobaias sobreviventes do primeiro experimento, ocorreu, porém, cura espontânea, mesmo a temperatura ambiente de 25° C (cobaia n.º 8, Tab. III). Isto demonstra que outros fatores, provavelmente imunológicos (3) podem ser também responsáveis pelas curas espontâneas observadas, principalmente em animais com lesões velhas. Entretanto, a temperatura seria, ao nosso ver, fator decisivo na cura, tanto de lesões velhas como recentes. Por fim, se analisarmos o

quadro de distribuição das úlceras por *L. braziliensis* no homem (8), verificamos que, como na cobaia, as maiores percentagens ocorrem nas zonas mais frias do corpo. Por isso, achamos que o tratamento térmico poderia ser de valor como terapêutica auxiliar da leishmaniose cutânea do homem.

ON THE INFLUENCE OF TEMPERATURE ON THE DEVELOPMENT OF LEISHMANIA SKIN LESIONS

Abstract

*This paper presents the results of a series of experiments carried out in order to study the role of skin temperature in the development of leishmaniasis by *Leishmania enriettii* Muniz and Medina, 1948, in guinea-pigs.*

These experiments were suggested by the following facts and evidence:

1 — *After development of the primary lesion at the site of inoculation, there is a generalization of the infection marked by the appearance of metastatic lesions, which occur always at the body extremities (2, 4, 5, 6, 7) where the temperature, under normal conditions, is below 36° C.*

2 — *It is possible to detect leishmania in other body sites, even in internal organs, where they are readily destroyed (7).*

3 — *It was observed that during very long and hot summers, spontaneous cures of leishmania sores do occur. These cures may be temporary or final.*

EXPERIMENT I — *To start with, we experimented on the influence of the site of inoculation on the development of primary and metastatic lesions, in order to check on the results obtained by the abovementioned authors.*

Five groups of eight animals each were inoculated by subcutaneous (venter, nose, dorsum, ear) and peritoneal routes.

All animals were kept at an environmental temperature of 25± 1°, and their skin temperatures at the sites of inoculation measured by means of a magnetic skin thermometer.

Mean temperatures obtained before inoculation were: venter (hair removed) 37.08° C; snout 27.69° C; dorsum (hair removed) 35.52° C; ear 26.5° C.

In snout and ear, which happen to be the sites having a low skin temperature, the primary lesions developed faster and evolved until the death of the animal. Lesions on the snout lead to death sooner than those on the ear, probably due to difficulties in breathing and feeding and exposure to secondary bacterial infections.

Inoculations in dorsal skin, with hair removed, produced slowly growing lesions with a tendency to regression.

The inoculation in ventral skin failed to develop into lesions.

All animals surviving long enough to show generalization of the infection were positive for metastatic lesion, with the exception of animals inoculated by subcutaneous ventral route. This might be explained by the ready destruction of the parasites by the high temperature of the belly wall.

All animals infected by intraperitoneal route showed a more rapid generalization than those inoculated by subcutaneous route, probably because in spite of the high internal temperature, the spreading of the parasites by the blood stream is faster.

EXPERIMENT II — Seven guinea-pigs survived the 159-day period of experiment I. One of them, n.º 8 on table III, in spite of the low environmental temperature, showed a definite regression of the lesions and was considered normal on the 186th. day. The other six, on the contrary, showed very extensive metastatic lesions. Four of these animals were put in an incubator at 37° C and the other two were kept at $25^{\circ} \pm 1^{\circ}$ C.

After 38 days (Table VI and Plates I, II), the four animals kept at 37° C showed healing of all their lesions and the ones at 25° C showed an increase of the lesions.

EXPERIMENT III — Ten guinea-pigs were inoculated at the snout and kept for 48 hours at $25^{\circ} \pm 1^{\circ}$ C, in order to give the parasites good starting conditions. After this period, five of them were transferred to an incubator at 38° C, the others being kept at the same temperature as before, and observed daily. The skin temperature of the animals kept in the incubator was as high as 37° C.

On the 8th. day, all animals of the first group were negative and those of the second group showed heavy local swelling.

The difference among the two groups became more evident as time went by, as can be seen on the pictures taken on the 15th. and 30th. day of the experiment (See Table VII and Plate III).

CONCLUSIONS

There is a definite relationship between skin temperature and the evolution of the disease. Baker & Ballesteros (1) had succeeded in treating three guinea-pigs and two human cases of leishmaniasis by the vapour heat process, but, they did not specify the temperature used. Our experiments showed that temperatures as low as 37 — 38° C are sufficient to induce the healing process.

However, there seem to exist certain factors, which might be of immunological nature, which are able to induce healing independently of the temperature process. This we were lead to believe, due to the occurrence of "spontaneous" cure in cases of guinea-pig with an old infection (see guinea-pig n.º 8, Table III).

Anyhow, it might be worth while to keep in mind that in guinea-pigs, as well as in humans, skin lesions by leishmania have a high incidence in body regions where the temperature is lower than 37° C (8) and this is why we think that the heat process might be of use in the treatment of human cutaneous leishmaniasis.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — BAKER, A. O. & BALLESTEROS, E. G. — 1957 — Tratamiento experimental de las ulceras leishmaniasicas por el procedimiento del calor del vapor. *Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop.* 17 (3): 115-9.
- 2 — CASTRO, F. T. DE — 1953 — Sôbre a leishmaniose espontânea em cobaias. *Bol. Inst. Osw. Cruz*, 2 (8): 4-5.
- 3 — COUTINHO, J. O. — 1954 — Nota sôbre a imunidade adquirida na leishmaniose da cobaia. *Leishmania enriettii*, MUNIZ & MEDINA, 1948. *Folia Clin. Biol.*, 21 (1): 15-8.
- 4 — GUIMARÃES, J. P. — 1952 — Observações sôbre a leishmaniose do cobaio. *Bol. Inst. Osw. Cruz*, 1 (4): 4.

- 5 — MEDINA, H. — 1946 — Estudos sôbre a leishmaniose. I — Primeiros casos de leishmaniose espontânea observados em cobaios. *Arq. Biol. e Tecnol.*, **1**: 39-74.
- 6 — MUNIZ, J. & MEDINA, H. — 1948 — Leishmaniose tegumentar do cobalo. *Leishmania enriettii* n. sp. *Hospital, R. J.*, **33** (1): 35-58 & *Arq. Biol. e Tecnol.*, **3**: 13-30.
- 7 — PARAENSE, W. L. — 1953 — The spread of *Leishmania enriettii* through the body of the guinea-pig. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg.*, **47** (6): 556-60.
- 8 — PESSÔA, S. B. & BARRETO, M. P. — 1948 — Leishmaniose tegumentar americana. Rio de Janeiro, Serviço de Documentação, Ministério da Educação e Saúde; 527 p.

EXPLICAÇÃO DAS ESTAMPAS

Estampa 8

Figs. 1-3 — Cobaias mantidas à temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$.

Estampa 9

Figs. 4-6 — Cobaias colocadas à temperatura de 37°C , durante 36 dias.

Estampa 10

Figs. 7-8 — 15 dias depois da inoculação. 7: cobaia mantida à temperatura de 38°C ; 8: cobaia mantida à temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$.

Figs. 9-10 — 30 dias depois da inoculação. 9: cobaia mantida à temperatura de 38°C ; 10: cobaia mantida à temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$.



OCORRÊNCIA DA BRUCELOSE CAPRINA NO ESTADO DE
SÃO PAULO CAUSADA PELA *BRUCELLA ABORTUS*.
OBSERVAÇÕES SOBRE UM SURTO DE
CARÁTER EPIZOÓTICO (*)

POR

A. D. Caldas e A. Nesti

Do Instituto Biológico de São Paulo

Desde que ZAMMIT (1905) demonstrou a existência da infecção natural em cabras por *Brucella melitensis*, em diferentes partes do mundo tem sido observada a ocorrência da brucelose caprina. Entretanto, entre nós, felizmente, esta zoonose ainda não foi assinalada, pelo menos a causada pela temível espécie *B. melitensis*, a mais patogênica para o homem e exatamente a mais encontrada na brucelose caprina em outros países (África do Sul, Estados Unidos, México, Argentina e países ao longo do litoral Mediterrâneo). No Brasil, a brucelose caprina tem sido assinalada apenas por inquéritos sorológicos realizados quase sempre em animais de matadouros: CARNEIRO (1933), ARTIGAS (1934), NEIVA (1934), MOSCI (1944), e FRANÇA e col. (1954) foram os que procederam às provas de sôro-aglutinação em número mais significativo de caprinos. No entanto, ROGICK (1941), realizando o maior inquérito sorológico efetuado até hoje no Brasil entre caprinos, ou seja procedendo à sôro-aglutinação em cerca de 1.000 animais e obtendo 100% de resultados negativos, pôs em dúvida a existência da brucelose caprina, pelo menos no Estado de São Paulo, apesar de já assinalada por outros pesquisadores em virtude de sôro-aglutinações positivas. Assim, ROGICK assinala que se realmente existisse a brucelose caprina no Estado de São Paulo, seu inquérito, feito cerca de 8 anos após aos dos três primeiros autores citados, revelaria uma positividade ainda maior do que a anteriormente obtida. Entretanto, apresentando o seu inquérito 100% de resultados negativos, ROGICK (1941) explica a positividade obtida pelos outros autores como sendo devida, provavelmente, à divergência de padronização de antígenos. Realmente, compulsando a literatura nacional sobre o assunto, mesmo posterior a ROGICK, não achamos referência sobre a ocorrência da brucelose caprina como doença, determinando abortos em rebanhos sob a

(*) Recebido para publicação em 16 de dezembro de 1958.

forma epizootica, como acontece entre nós com a brucelose bovina e suína. Assim, as citações nacionais resumem-se na verificação de sôro-aglutinações positivas isoladas e sem qualquer correlação com sintomas clínicos de brucelose ou com o isolamento de *Brucella* ou ainda com surtos de caráter epizootico.

Outra questão interessante a considerar na brucelose caprina refere-se ao agente causal que tem sido isolado nos países onde esta zoonose é freqüente. A espécie *B. melitensis* é a que sistematicamente tem sido incriminada. A ocorrência da brucelose caprina por outras espécies de brucelas é realmente rara como pudemos verificar ao compulсар a literatura. HUDDLESON afirma mesmo que, até 1943, não havia sido demonstrada a existência de infecção natural em caprinos por *B. abortus* ou por *B. suis*. Na pesquisa bibliográfica que efetuamos referente ao período posterior a 1943, somente encontramos uma referência, em 1953, na Argentina (JURADO & CEDRO), de dois caprinos que estavam alojados vizinhos a vários suínos portadores de brucelose, e que se contaminaram, possibilitando a êsses autores o isolamento de *B. suis* de cabras naturalmente infectadas. Quanto à infecção natural de caprinos por *B. abortus*, deve ser realmente rara, pois apesar dessa possibilidade ter sido referida por vários autores, não pudemos encontrar na literatura compulsada qualquer referência. A infecção experimental em cabras por *B. abortus* foi conseguida com grande facilidade por DOYLE (1939), por inoculação conjuntival.

No presente trabalho descrevemos a ocorrência da brucelose caprina no Estado de São Paulo, devida à infecção natural por *B. abortus*, sob a forma de grave surto de caráter epizootico, determinando, inclusive, em uma criação de cêrca de 200 caprinos, consideráveis prejuízos econômicos, pela incidência de elevado número de abortos em série e várias mortes de cabras abortantes.

OBSERVAÇÕES CLÍNICAS

Em uma criação de cêrca de 200 caprinos mestiços Toggenburg e Nubiana, em uma fazenda no interior do Estado de São Paulo, foi observada a existência de uma moléstia de caráter epizootico caracterizada pelo aparecimento de uma sucessão extremamente rápida de numerosos casos de abortos (cêrca de 70) e corrimento vaginal abundante nas cabras abortantes com cêrca de 15% de mortalidade entre estas. Êste surto epizootico ocorreu com rapidez (cêrca de um mês), fato êste para o qual queremos chamar a atenção; por êste

motivo não nos foi possível a observação "in loco" dos abortos e das cabras mortas. Foi-nos relatado que as cabras abortantes apresentaram copioso corrimento vaginal purulento côm de chocolate e que as mortes ocorridas nestas cabras se verificaram um ou dois dias após aos abortos. Foi observado também que, excetuando estas cabras que abortaram, o restante do rebanho estava em boas condições de saúde não se verificando presença de orquite nos machos, inflamações articulares ou perda da vivacidade. Observando o tipo de criação, pudemos anotar que os caprinos eram criados a maior parte do tempo soltos nos campos, em regime semi-extensivo, pois diariamente os animais eram recolhidos a um estábulo onde eram arraçoados com milho e farelada. Tratava-se portanto de animais bem alimentados. Nos campos onde passavam pastando a maior parte do tempo, pudemos observar que as cabras viviam em promiscuidade com vacas, pertencentes à mesma fazenda. Por informação dos tratadores das cabras tivemos conhecimento que às vezes eram elas surpreendidas ingerindo placenta de vacas. Devemos assinalar que fomos ainda informados da ocorrência ocasional de abortos entre as vacas. Outra informação importante se refere ao fato das cabras terem sido alimentadas durante um certo tempo com leite desnatado e com leite impróprio para consumo, proveniente de uma usina de laticínios, em zona de brucelose bovina endêmica.

Após essa ocorrência de abortos e corrimentos vaginais nas cabras, mesmo antes de serem postas em prática as medidas profiláticas recomendadas, observamos que a moléstia regrediu clinicamente de uma maneira extremamente rápida: um mês após, o rebanho estava praticamente sadio sem um único caso de aborto e sem outros sintomas de brucelose. Mantivemos o rebanho em observação clínica pelo menos durante 24 meses e, até agora, nada de anormal pudemos verificar. Nestas condições, a moléstia observada nesses caprinos apresentou-se sob a forma de um verdadeiro surto epizootico.

É importante assinalar que a moléstia, surpreendendo o rebanho exatamente durante o inverno, época na qual as cabras na grande maioria dão cria, ocasionou prejuízos econômicos ainda mais consideráveis, pois, em virtude da grande incidência de abortos, o número de nascimentos de cabritos foi consideravelmente reduzido. Normalmente nessa época era esperado o nascimento de cerca de 100 cabritos, porém, na ocasião da incidência da moléstia o número de cabritos nascidos caiu para cerca de apenas 20. Houve portanto uma perda de cerca de 80% de cabritos.

OBSERVAÇÕES DE LABORATÓRIO

Inicialmente, na própria fazenda, realizamos com as 103 cabras existentes em lactação a prova do "ring test" com antígeno corado pelo tetrazólio, segundo a técnica clássica utilizada para o diagnóstico da brucelose bovina. Como esta prova é considerada excelente para o diagnóstico da brucelose em um rebanho, não sendo segura para evidênciação individual dos animais infectados, achamos conveniente executar o "ring test" em amostras de leite colhidas da mistura da ordenha de grupos de 10 cabras. Assim, procedendo às provas do "ring test" correspondentes às misturas de leite de grupos de 10 cabras, achamos tôdas as provas fortemente positivas.

Em seguida, coletamos sangue das 103 cabras em lactação e dos 4 bodes existentes em um total de 107 caprinos, com o fim de procedermos às provas da sôro-aglutinação lenta para o diagnóstico da brucelose, segundo a técnica do Laboratório de Veterinária do Ministério da Agricultura e Pesca da Inglaterra (Weybridge) com antígeno padronizado fornecido pelo mesmo. Simultaneamente, com os mesmos sôros efetuamos a prova da fixação em superfície de Castañeda para o diagnóstico da brucelose (CALDAS & col., 1955). Os resultados destas duas séries de exames estão resumidos na Tabela I.

T A B E L A I

Resultados das provas de sôro-aglutinação lenta e fixação em superfície para o diagnóstico da brucelose, efetuadas com sôros sanguíneos de 107 caprinos

N.º de animais	Título da aglutinina	Resultados segundo a porcentagem da fixação em superfície				
		0%	25%	50%	75%	100%
77	neg.	69	7	1	0	0
10	1:10	5	4	1	0	0
2	1:20	1	1	0	0	0
3	1:40	1	2	0	0	0
9	1:80	0	0	4	5	0
5	1:160	0	0	0	1	4
1	1:320	0	0	0	0	1

Em virtude da impossibilidade, já referida, de surpreendermos os fetos abortados ou os corrimentos vaginais, procuramos, a seguir, isolar o agente causal por meio de culturas do leite das cabras com títulos de aglutininas mais elevados. Assim, após várias tentativas com resultados negativos, conseguimos isolar do leite da cabra com título 1:320, por meio de uma técnica prática (correntemente empregada na Seção de Higiene Comparada do Instituto Biológico) utilizando-se o frasco de Castañeda (CALDAS, 1953), uma amostra de *Brucella*, que se comportou, pela exigência inicial de CO₂ e pelas provas de cromobacteriostase, como sendo da espécie *Brucella abortus*. Esta amostra, inoculada em cobaias, produziu as lesões características de brucelose, com a presença de títulos elevados no soro sanguíneo desses animais de laboratório. O reisolamento desta amostra de *Brucella* do baço das cobaias inoculadas foi conseguido com grande facilidade.

Após a execução das medidas profiláticas recomendadas, visando mais o interesse do proprietário, consistentes na segregação dos animais positivos à aglutinação e fixação em superfície e transferência da criação das cabras para outro local distante das vacas, foram coletadas novas amostras de sangue e de leite, para repetição dos mesmos exames. Assim, após a transferência da criação para outro local, decorridos dois anos do surto de abortos foram coletadas novas amostras de sangue e de leite de 137 cabras em lactação com os seguintes resultados:

1) "Ring test" — realizado em mistura de leite de cada 4 cabras — foi completamente negativo em todas as provas.

2) Soro-aglutinação lenta — efetuada em 137 sôros, foi negativa em 133 casos, sendo positiva somente no título 1:20 em 4 sôros.

3) Fixação em superfície — realizada com os mesmos 137 sôros — foi negativa (0%) em 134 casos, sendo positiva somente a 25% em apenas 3 sôros.

Quanto às cabras positivas segregadas, pudemos verificar que os títulos caíram rapidamente, e mesmo 10 meses após, a soro-aglutinação foi na grande maioria completamente negativa. Na cabra com título de 1:320, 6 meses após, o mesmo caiu para 1:20. De todas as cabras com aglutininas residuais foi exaustivamente tentado o isolamento de brucela do leite, sendo obtidos resultados completamente negativos. Mesmo a biópsia dos gânglios supra-mamários foi

feita, e o material inoculado em cobaias, também com resultados negativos.

DISCUSSÃO

A ocorrência do elevado número de abortos e corrimentos vaginais nessa criação de cerca de 200 caprinos, associada às provas positivas do "ring test", aglutinação positiva (1:80 ou acima), fixação em superfície positiva e isolamento de *Brucella abortus* do leite, permitem-nos afirmar que o rebanho caprino em questão foi acometido de brucelose. Segundo RENOUX & ALTON (1955) o diagnóstico da brucelose caprina em um rebanho pode ser feito com segurança pelo resultado da sôro-aglutinação, salientando êstes autores o valor desta prova para o diagnóstico de grupo: "se em um rebanho uma ou mais cabras reagirem a uma taxa igual ou superior a 1:80, pode-se afirmar com certeza que o rebanho inteiro está infectado". Em relação à prova da fixação em superfície de Castañeda, êsses autores também verificaram que o teste do papel é excelente para o diagnóstico da brucelose caprina em um rebanho, e do mesmo modo que a prova da aglutinação, embora também não servindo para o diagnóstico individual, dá ótimos resultados para o diagnóstico de grupo. Nestas condições, apenas pelos resultados positivos da sôro-aglutinação e da fixação em superfície, obtidos nesse rebanho caprino acometido de abortos, poderíamos afirmar com segurança que se tratava de brucelose.

Compulsando a literatura nacional sôbre o assunto, pudemos anotar que possivelmente esta é a primeira vez entre nós que se constatou a existência da brucelose caprina como doença, sob a forma de surto de caráter epizootico determinando em uma criação graves prejuízos econômicos pela ocorrência de abortos e mortalidade entre as cabras. Nas observações clínicas já tivemos oportunidade de comentar a natureza dêsses prejuízos.

Fato interessante também a assinalar foi o modo provável de contágio das referidas cabras. Em primeiro lugar, a promiscuidade da criação de caprinos com as vacas existentes na fazenda, já com história de abortos, possibilitando por parte das cabras a ingestão de placentas bovinas possivelmente contaminadas. Outra fonte provável de contágio dos caprinos foi a ingestão por parte dêstes, por um certo tempo, de leite desnatado e leite condensado de uma usina de laticínios, em uma zona onde a brucelose bovina é endêmica. Verificamos mesmo que cerca de 30% dos latões de leite recebidos pela usina de laticínios apresentaram "ring test" fortemente positivo.

O isolamento da *Brucella abortus* dêste surto de brucelose caprina permite considerar vários aspectos dêste problema. Em primeiro lugar, provavelmente, esta é uma das primeiras referências sôbre a ocorrência da brucelose caprina, por infecção natural devida à espécie *B. abortus*, felizmente para nós, pois normalmente nos países onde essa zoonose é endêmica, é a temível espécie *B. melitensis* o agente causal sempre isolado. Nestas condições, dada a pequena patogenicidade da *B. abortus* para o homem, êste surto de brucelose caprina, sob o ponto de vista de saúde pública, deve ser encarado do mesmo modo do que a brucelose bovina. Aliás, podemos adiantar que neste caso, examinando o sôro sanguíneo de todos os tratadores das cabras acometidas de brucelose por *B. abortus*, por duas vêzes a sôro-aglutinação e fixação em superfície deram resultados 100% negativos. Além do mais, êsses tratadores não referiram sintoma algum de brucelose.

Outro fato para o qual queremos chamar a atenção é a rapidez com que ocorreu e terminou êste surto de brucelose caprina: logo após a ocorrência de abortos (verificado dentro de um mês) observamos que a doença regrediu clinicamente de um modo extremamente rápido, sendo que 40 dias após não se verificou nenhum sintoma aparente e o rebanho se tornou praticamente sadio. Mesmo as cabras abortantes e reagentes, após a doença, rapidamente voltaram à normalidade, sem apresentarem mais sintomas, e até deram cria normalmente. Nas mesmas condições no período de 24 meses após a ocorrência dos abortos, não se verificou mais, em todo o rebanho, um único caso de aborto ou outro sintoma de brucelose. Também pelos exames de laboratório, sôro-aglutinação, fixação em superfície, "ring test", inoculação em animais e cultura do leite efetuados dois anos após os casos de abortos, todos êstes exames com resultados de significação negativa em grupo (RENOUX & ALTON, 1955), pudemos chegar a conclusão que, pelo menos nesta ocasião, o rebanho estava sadio em relação à brucelose. Êste êxito nos resultados obtidos, com o desaparecimento da brucelose do rebanho, se deve a dois motivos: 1) as medidas profiláticas executadas, consistentes principalmente na transferência da criação de caprinos para um local distante das vacas, eliminando-se assim a fonte de contágio; 2) o fato da brucelose caprina neste caso ter sido causada pela espécie *B. abortus* e não a espécie *B. melitensis*, possivelmente determinou a não persistência da infecção nas cabras, pois já foi observado que quando uma espécie de *Brucella* parasita outro hospedeiro que não o habitual, a infecção tem tendência a persistir por pouco tempo com possibilidade

diminuída de alastramento. Este fato por diversas vezes foi verificado entre vacas infectadas por *B. suis*. Neste caso não se observa a disseminação da brucelose entre as vacas, como acontece com a *B. abortus*, e, uma vez eliminada a fonte de contágio, a infecção tende a persistir exiguamente. Assim, é provável que, para surgir outro surto natural de brucelose caprina por *B. abortus*, haja necessidade de contágio por brucelas oriundas de bovinos. Outro fato que vem a favor desta pequena persistência da infecção quando devida à *B. abortus* é o seguinte: uma das medidas profiláticas, ao nosso alcance, executadas, consistiu na segregação dos animais reagentes. No entanto, RENOUX & ALTON (1955) afirmam textualmente: "A segregação somente das cabras sôro reagentes não permite eliminar a brucelose do rebanho". Estes autores se referiam à brucelose caprina causada pela *B. melitensis*. No caso presente todo o rebanho caprino foi transferido para longe das vacas; provavelmente foi esta medida a que contribuiu de modo decisivo para o desaparecimento da infecção nas cabras, por ser eliminada a fonte de contágio, se bem que a segregação dos animais reagentes não deveria surtir êxito, segundo aqueles autores. Em outras palavras, sendo as provas de sôro-aglutinação e fixação em superfície úteis apenas no diagnóstico de grupo, jamais se prestando para a identificação individual dos animais portadores de brucelas (RENOUX & ALTON, 1955), foi a eliminação da fonte de contágio a medida que surtiu êxito, evidenciando assim a pequena persistência e a não disseminação da infecção por *B. abortus* em cabras, como foi comprovado pela negatividade dos exames de laboratório posteriores.

Apesar destas considerações, estamos mantendo o rebanho caprino em questão em permanente observação clínica e principalmente bacteriológica (isolamento de brucelas do leite e gânglios supra-mamários), para surpreender, se possível, um novo surto ou, pelo menos, eliminação de brucelas.

Como conclusão prática dêste trabalho é aconselhável que criações de cabras, especialmente em zonas de brucelose bovina endêmica, jamais se façam em promiscuidade com bovinos, pela possibilidade aqui demonstrada de infecção natural em caprinos por *B. abortus*. Também, como já foi observado na Argentina por JURADO & CEDRO (1953), não é conveniente a criação de caprinos mesmo nas proximidades de suínos, pois estes, eliminando a *B. suis*, podem contagiar do mesmo modo as cabras. Assim sendo, queremos chamar a atenção dos nossos criadores que, embora não existindo entre nós, felizmente, a brucelose caprina pela *B. melitensis*, os nossos caprinos

não estão livres de adquirirem essa moléstia, por outras espécies de *Brucella*, especialmente em nosso meio, em virtude do aumento do índice de brucelose nos nossos rebanhos bovino e principalmente no suíno. Nas mesmas condições deve-se dar atenção à possibilidade de contaminação de caprinos por alimentos veiculadores de brucelas.

S U M Á R I O

Os autores assinalam a ocorrência da brucelose caprina, no Estado de São Paulo, devida à infecção natural por *Brucella abortus*, sob a forma de grave surto de caráter epizootico, determinando, inclusive, em uma criação de cerca de 200 caprinos, consideráveis prejuízos econômicos, pela incidência de numerosos casos de aborto, corrimentos vaginais e morte de várias cabras abortantes. Efetuadas em 107 caprinos adultos as provas do "ring test", sôro-aglutinação lenta, e fixação em superfície de Castañeda, verificou-se que tôdas essas provas apresentaram resultados altamente sugestivos de significação positiva em grupo. Por meio da cultura do leite de uma cabra com título a 1:320, isolou-se uma amostra de *Brucella* que, pela exigência inicial de CO² e cromobacteriostase, se comportou como sendo da espécie *B. abortus*. Verificou-se que possivelmente foram duas as fontes de contágio das cabras: 1) promiscuidade da criação de caprinos com vacas existentes na fazenda 2) alimentação dos caprinos, por um certo tempo, com leite desnatado e leite condenado provenientes de uma usina de laticínios, de uma zona de brucelose bovina endêmica.

Observou-se que os numerosos casos de aborto sob a forma epizootica ocorreram em série e rapidamente (cerca de um mês), o mesmo acontecendo com os sintomas clínicos (particularmente corrimento vaginal). Mantendo-se o rebanho em observação por dois anos, verificou-se que em todo êsse tempo não ocorreu um único caso de aborto ou outro sintoma de brucelose caprina. A não persistência da infecção, observada pela negatividade de sintomas, foi comprovada por novos exames de laboratório efetuados cerca de dois anos após a ocorrência da moléstia, todos com resultados negativos. Exaustivas tentativas de isolamento de brucelas do leite e gânglios supra-mamários apresentaram resultados significativamente negativos. Contribuíram para a obtenção dêstes resultados negativos, com o desaparecimento da brucelose do rebanho, os seguintes fatos: 1.º) mudança da criação de caprinos para um local distante das vacas, eliminando-se assim a fonte de contágio; 2.º) a não persistência da infecção, neste caso causada pela *B. abortus*. Apesar

dessas verificações, os autores estão mantendo o rebanho caprino em questão em observação bacteriológica, para, se possível, surpreender ainda uma eliminação de brucelas.

Como conclusão prática deste trabalho, os autores aconselham que criação de caprinos, especialmente em zonas de brucelose bovina ou suína endêmicas, jamais se faça em promiscuidade com bovinos ou com suínos, dada a possibilidade de infecção natural devida à *B. abortus* ou à *B. suis*, como foi demonstrado neste caso e na Argentina (JURADO & CEDRO, 1953), respectivamente. Os autores também ressaltam a possibilidade de contaminação de caprinos por alimentos veiculadores de brucelas.

THE OCCURRENCE OF A NATURAL INFECTION IN GOATS WITH
BRUCELLA ABORTUS IN SÃO PAULO, BRAZIL.
OBSERVATIONS ON AN EPIZOOTIC OUTBREAK.

Abstract

In this paper the authors report the occurrence of Brucellosis Caprinus in the State of São Paulo, Brazil, caused by a Brucella abortus natural infection. Epizootic abortions in about 200 goats. many cases of vaginal discharge and the death of a few animals having been recorded. The following laboratory tests for brucellosis were made with the 107 adult goats: 1) tetrazolium ring test with 10 samples of milk from as many goats groups: all of the results were strongly positives; 2) tube agglutination: of the 107 sera tested, 15 were positive in at least a titer of 1:80 (15 positive cases); 3) surface fixation test of Castañeda: of the 107 sera tested, 11 showed strong reactions (75 or 100% of fixation). From the milk of a goat with a agglutinin titer of 1:320, a strain of Brucella was isolated by culture, which by the usual identification methods proved identical with B. abortus. The source of B. abortus contamination was probably: 1) infection of the goats by B. abortus eliminated by cows living in promiscuity on the same farm; 2) skim milk and refuse milk, from a plant of an endemic bovine brucellosis area, which were fed the goats for a few days.

Twenty four months after the epizootic abortions and after the prophylactic measures, it was verified, by laboratory tests, that there was not a persistence of this B. abortus infection in the goats. All brucellosis tests, including Brucella isolation, resulted completely negative, even 2 years later, not a single case of abortion or any other symptom of brucellosis having been observed.

As a practical conclusion, the authors recommend that goats,

especially in endemic brucellosis areas, should not be maintained in promiscuity with cows or with hogs, because of the possibility of natural infection of goats with B. abortus or B. suis, as was observed in this case and in Argentina, respectively. The possibility of infection of goats by contaminated food with Brucella must also be considered.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — ARTIGAS, P. T. — 1934 — Febre ondulante. Estudo sobre os primeiros casos observados em São Paulo. *An. Paul. Med. Cir.*, 27 (2): 153-191.
- 2 — CALDAS, A. D. — 1953 — *Cit. em Bacteriologia e Imunologia*, Otto Bier, 8.^a Edição — Edição Melhoramentos, 1957, pág. 561.
- 3 — CALDAS, A. D. PLANET, N. G., & MACHADO, L. J. P. — 1955 — O teste de Fixação em Superfície de Castañeda, para o diagnóstico da brucelose. Observações sobre sua execução e leitura. *Arg. Inst. Biol.*, 22: 87-92.
- 4 — CARNEIRO, V. — 1933 — Em torno da febre ondulante. Brucelose bovina e sua frequência em São Paulo. *Rev. Soc. Paul. Med. Vet.*, 3 (5-6): 126-133.
- 5 — DOYLE, T. M. — 1939 — *Brucella abortus* infection of goats. *Journ. Comp. Pat. Ther.*, 52: 89.
- 6 — FRANÇA, I., FERREIRA, G., & SIQUEIRA, N. — 1954 — Incidência da brucelose caprina em Belo Horizonte. *Rev. Mil. Rem. Vet.*, 14 (4): 175-184.
- 7 — HUDDLESON, I. F. — 1943 — Brucellosis in man and animals. New York — The Commonwealth Fund.
- 8 — JURADO, F. R. & CEDRO, V. C. F. — 1953 — Aislamiento de *Brucella suis* en cabras. *Rev. Med. Vet. Buenos Aires*, 35 (1): 23-24.
- 9 — MOSCI, A. — 1944 — Em torno da incidência das bruceloses animais. *Bol. Soc. Bras. Med. Vet.*, 13 (2): 105-117.
- 10 — NEIVA, C. 1934 — Aglutininas para o gênero *Brucella* em soro de animais. *Rev. Ind. Anim.*, 2 (1): 81-85.
- 11 — RENOUX, G. & ALTON, G. — 1955 — Études sur la brucellose ovine et caprine. IV — Réactions sérologiques dans le sang et le lait de chèvre récemment infectées par *Br. melitensis*. *Arch. L'Inst. Pasteur Tunis*, 32 (3,4): 523-550.
- 12 — ROGICK, F. A. — 1941 — Pesquisas sobre a brucelose caprina em São Paulo. *Bol. Ind. Anim.*, 10 (1): 33-37.
- 13 — ZAMMIT, T. — 1905 — A preliminary note on the examination of the blood of goats suffering from Mediterranean fever. *Reports of the Commission on Mediterranean Fever*, part 3, p. 83. London: Harrison and Sons.

O EDEMA DA BARBELA COMO ÚNICA MANIFESTAÇÃO DA CÓLERA AVIÁRIA E REPRODUÇÃO EXPERIMENTAL DA AFECÇÃO (*)

POR

R. C. Bueno

Do Instituto Biológico de São Paulo

Com 2 tabelas no texto

O edema da barbela se manifesta por grande reação inflamatória, seguida de acumulação de líquido edematoso que, ao fim da primeira semana, se transforma em massa caseosa, a qual pode ser removida cirurgicamente por não aderir aos tecidos circunvizinhos.

A *Pasteurella multocida* é freqüentemente isolada da afecção, podendo ser considerada como o agente etiológico da doença.

A finalidade dêste trabalho é a verificação de casos de edema da barbela provocados pela *P. multocida*, com ausência das formas epizootica e enzoótica da cólera aviária e a reprodução experimental da afecção.

SEDDON (13), na Austrália, foi o primeiro a descrever o processo clínico da afecção, isolou a *P. multocida* em todos os casos agudos, e reproduziu o edema experimentalmente.

Posteriormente, CARPENTER (1) isolou a *P. multocida* do edema da barbela de um galo e de uma galinha, inoculou 4 aves normais na barbela, reproduzindo o edema em 18 horas e morte de 4 a 6 dias. De todas as aves foi isolada a *P. multocida* das barbelas, coração, fígado e baço.

DAVIS (4) fez minucioso estudo da afecção e observa que a evolução do edema dura de 2 a 3 semanas e termina quase sempre pela cura e é geralmente unilateral. O líquido do edema, ao fim da primeira semana, se transforma em substância caseosa, que não adere aos tecidos vizinhos, sendo facilmente removível. A doença atinge aves criadas em parques ou em confinamento, sendo observada em machos e fêmeas, mas primariamente é moléstia dos machos. Atinge aves adultas e jovens, bem como frangos de quatro meses e meio, mas não frangas, o que é explicado pelo maior desenvolvimento das barbelas nos frangos. O tratamento mais prático consiste na ressecção da barbela.

(*) Trabalho recebido para publicação em 22 de dezembro de 1958.

Esse mesmo autor isolou 3 amostras de *P. multocida* de aves com ruptura de gemas, e conseguiu reproduzir o edema inoculando a barbela de aves normais, que morrem 2 a 6 dias após a inoculação. De tôdas as aves foi reisolada a *P. multocida*. Com oito amostras de *P. multocida* também isoladas de aves com ruptura de gemas, DAVIS não conseguiu provocar edema, e não observou morte das aves inoculadas na barbela ou subcutâneamente. Em outros casos de edema, o mesmo autor isolou *B. coli*, *B. pyocianico* e *Staphilococcus albus*, os quais inoculados nas barbelas de aves normais nada provocaram.

Finalmente DAVIS isolou nove amostras de um bacilo, não identificado, que inoculado nas barbelas de galos provocou edema, mas não conseguiu reisolá-lo.

CSONTOS (3) estudou 88 casos de edema da barbela, após epizootias de cólera aviária, e de 60% das aves examinadas isola *E. coli*, *P. aeruginosa*, *estreptococos*, *estafilococos*, sendo que em alguns casos nada isolou. A *P. multocida* foi isolada de 40% dos casos examinados.

Inoculou 9 aves na barbela com 0,2 cm³ de cultura de 20 horas, e após 24 horas da inoculação, verifica infiltração edematosa em tôdas as aves. Quatro dessas aves morrem em 30 horas, uma em 6 dias e, finalmente, quatro apresentam a evolução completa do edema. Não obstante, dessas últimas aves não conseguiu isolar a *P. multocida*. Admite o autor que, nos casos nos quais não conseguiu reproduzir o edema, a causa tenha sido conseqüente a uma diminuição da virulência da *P. multocida* ou resistência das aves.

LESBOUYRIES et BERTHELON (6) isolaram a *P. multocida*, de edema da barbela, reproduziram a afecção experimentalmente em 3 aves, uma com amostra originária de edema e 2 com amostra isolada de medula óssea. Duas aves, nas quais reproduziram o edema e após 30 dias, foram inoculadas intramuscularmente com a mesma amostra, sucumbem após 8 dias da inoculação. Com essa verificação acreditam que a barbela não se presta a uma evolução septicêmica da doença, mas sim a uma infecção localizada sob a forma de abcedação.

REIS e NÓBREGA (11) verificaram que a hipótese sugerida por LESBOUYRIES ET BERTHELON não tem fundamento, pois com amostras virulentas, mesmo inoculadas em quantidades ínfimas na barbela, determinam septicemia e morte, às vèzes se notando na barbela inoculada acentuado edema.

SZYFRES E TRENCHI (14) observaram a afecção em uma granja,

onde não havia antecedentes de cólera aviária em forma epizootica, tendo o edema surgido na mesma, após a introdução de um peru que sucumbiu de cólera aviária. Os casos de edema verificados atingiram somente galos. Isolam a *P. multocida* que demonstram ser de baixa virulência para galinhas.

Com a amostra originária do edema e a amostra isolada do peru reproduzem o edema em aves normais por escarificação ou via subcutânea.

Inoculam 7 galos na barbela com amostras virulentas provenientes de epizootias recentes. Cinco galos morrem e 2 sobrevivem e apresentam o edema.

MATERIAL E MÉTODOS

AVES COM EDEMA DA BARBELA — Foram utilizadas 79 aves da raça leghorn branca, 54 galos e 25 galinhas. Todas as aves se apresentavam com edema da barbela, 95% dos casos eram edemas unilaterais e somente 5% bilaterais.

Essas aves procederam de seis granjas que há muitos anos, periodicamente, vêm sendo examinadas pelo Instituto Biológico, o qual está sempre ciente do estado sanitário dessas criações, nas quais nunca foi constatada a cólera aviária.

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DA *P. multocida*. — Inicialmente o edema era desinfectado com tintura de iodo e, com uma seringa comum de 2 ou 3 cm³, munida com uma agulha 25x7, era feita punção do líquido edematoso, em seguida semeado em tubo de caldo simples, ao qual eram adicionadas algumas gotas de sangue hemolisado de carneiro. Após 24 horas de estufa a 37° C, semeava-se a cultura em placas de agar a 1% e 10% de sangue, e em teague.

Isoladas as colônias, foram as mesmas submetidas às provas culturais em série constituída por: glicose, manita, sacarose, lactose, sorbita, dulcita, xilose, manose, leite tornassolado, leite simples, glicerina, galactose, levulose, arabinose e a prova do indol.

PESQUISA DE PORTADORES DE CÓLERA. — Todas as aves foram submetidas ao exame do muco da fenda palatina. Retirado o muco por meio de uma pipeta estirada e semeado em caldo simples, após permanência de 3 horas em estufa a 37° C, era inoculado no músculo de pombos

ou em peritônio de camundongos, de acôrdo com a técnica estabelecida para a pesquisa de aves portadoras de cólera aviária (7, 9, 12).

DETERMINAÇÃO DA VIRULÊNCIA. — A virulência das amostras de *P. multocida*, isoladas, foi determinada em camundongos que receberam, intraperitonalmente, 0,1 cm³ da cultura em caldo simples, de 24 hs. a 37° C., tendo sido empregado o método de REED E MUENCH. (10). Para cada amostra foram inoculadas 10 aves normais com as doses de 0,5 cm³ e 1 cm³ respectivamente na barbela e músculo.

EDEMAS EXPERIMENTAIS. — Foram inoculados 105 galos normais da raça leghorn branca, 77 galos receberam 0,2 cm³ de culturas de *P. multocida* na barbela, de amostras isoladas de edemas das barbelas, 20 galos foram inoculados na barbela com 0,2 cm³ de cultura da amostra 109 T. e 8 galos foram inoculados na barbela com 0,2 cm³ da amostra P. 354 (virulenta e isolada recentemente).

RESULTADOS

Foram isoladas 6 amostras de *P. multocida* das barbelas das aves examinadas, e 3 da fenda palatina conforme a Tabela 1. As amostras isoladas foram incluídas na coleção da Seção de Ornitopatologia sob os ns. 23, 24, 25, 26, 27 e 34.

TABELA 1

Granjas, número de aves e amostras de *P. multocida* isoladas de edema da barbela e fenda palatina

GRANJA	N.º de galos	N.º de galinhas	AMOSTRAS ISOLADAS	
			EDEMA	FENDA PALATINA
A	36	4	2	2
B	12	6	1	0
C	0	6	1	0
D	2	0	1	0
E	4	6	0	1
F	0	3	1	0
Total 6	54	25	6	3

Das 6 amostras de *P. multocida* isoladas dos edemas, 5 foram de galos e uma de galinha, enquanto as 3 amostras isoladas da fenda palatina 2 foram de galos e 1 de galinha.

As amostras isoladas somente cresceram em caldo simples, quando a êste foram adicionadas algumas gotas de sangue hemolizado de carneiro. O crescimento é pequeno e há depósito no fundo do tubo, com aspecto granuloso. Com passagens sucessivas de 3 em 3 dias em caldo simples com sangue, após cerca de 8 a 10 passagens, elas se modificaram, tornando-se pouco granulosas e com depósitos muito reduzidos. Não obstante, uma das amostras foi isolada diretamente em placa.

Quanto às provas culturais, tôdas as amostras fermentaram a glicose, manita, sacarose, levulose, manose, sorbita e galactose. A lactose, dulcita, glicerina e arabinose não foram fermentadas por nenhuma das amostras, enquanto a xilose foi fermentada por cinco amostras e não o foi somente por uma, a de n.º 27.

O leite simples e o leite tornassolado não foram alterados e a produção do indol foi constante em tôdas as amostras.

PESQUISAS DE PORTADORES DE CÓLERA. — Foram isoladas 3 amostras de *P. multocida* da fenda palatina, duas de aves da granja A, da qual foram isoladas também 2 amostras de *P. multocida* da barbela, e uma de aves da granja E, não tendo sido isolada desta nenhuma amostra de *P. multocida* da barbela.

As amostras de *P. multocida*, isoladas da fenda palatina em tôdas as provas a que foram submetidas, se comportaram igualmente como as amostras isoladas dos edemas.

DETERMINAÇÃO DA VIRULÊNCIA. — A virulência das amostras isoladas, avaliada pela L D 50 (dose 50% letal), variou de 1: 3.289 a 1: 112.500. A inoculação das amostras em aves adultas na dose de 0,5 cm³ a 1 cm³ no músculo ou nas barbelas não provocou nenhuma morte mas não vacinou.

EDEMA EXPERIMENTAL. — Inoculados 77 galos na barbela com a dose de 0,2 cm³ com as amostras 23, 24, 25, 26, 27 e 34, resultou a reprodução de 21 edemas com lesões iniciais, que não chegaram a evoluir, tendo-se observado somente aumento de temperatura e pequeno espessamento da barbela.

TABELA 2

Inoculações de galos para obtenção de edema experimental.

AMOSTRA	N.º DE GALOS	EDEMAS OBTIDOS	%
23	10	2	20%
24	15	3	20%
25	10	1	10%
26	10	1	10%
27	12	12	100%
34	20	2	10%
109 T	20	0	0%
354	8	4	50%

Vinte galos inoculados na barbela com 0,2 cm³ de cultura da amostra 109 T, obtida em laboratório e que possui propriedades vacinantes, não apresentaram nenhuma reação nas barbelas.

A inoculação da amostra P. 354, na barbela de oito galos normais, provocou a morte de 4 galos, em 18 a 48 horas após inoculação e reproduziu o edema com evolução completa em 4 galos.

Os galos, que apresentaram o edema, foram sacrificados 17 dias depois e as culturas de fígado, baço, medula óssea e coração foram negativas para *P. multocida*. Entretanto, o exame para pesquisa de portadores de cólera aviária demonstrou que dois galos possuíam a *P. multocida* na fenda palatina.

DISCUSSÃO

O edema da barbela, conseqüente a epizootias de cólera aviária, já foi observado por vários autores como CARPENTER (1), CSONTOS (3), LESBOURIES & BERTHELON (6), e REIS & NÓBREGA (11). Na Seção de Ornitopatologia do Instituto Biológico, também já tivemos oportunidade de constatar inúmeros casos.

De outro lado, a verificação de edema da barbela como única manifestação da cólera aviária, sem constituir seqüela de epizootia da moléstia, e com ausência da forma enzoótica da mesma, ainda não se verificou.

No trabalho de SZYFRES & TRENCHI (14), embora o caso por eles estudado não tivesse antecedentes de cólera, em sua forma epizootica, ficou demonstrado que na granja onde foi feita a observa-

ção, houve entrada de um peru, que sucumbiu de cólera, anteriormente ao aparecimento dos casos de edema da barbela.

Com o isolamento de amostras de *P. multocida* de edema da barbela das aves utilizadas neste trabalho e que procederam de criações, nas quais foi constatada com segurança a ausência de antecedentes de cólera aviária, pela primeira vez é revelada a existência de edema da barbela, constituindo a única manifestação da cólera aviária, independente do aparecimento anterior da moléstia, quer sob a forma epizootica ou enzoótica.

As amostras de *P. multocida* isoladas de edema da barbela demonstraram ser de baixa virulência, dado que a LD 50 (dose 50% letal) variou entre 1: 3.289 a 1: 112.500, enquanto para as amostras virulentas a LD 50 atinge até 1: 2.500.000 como foi demonstrado por NÓBREGA & BUENO (8).

As provas de inoculação em aves adultas (10 aves para cada amostra) intramuscular ou nas barbelas, com culturas de 24 h. e nas doses de 0,5 cm³ e 1 cm³ respectivamente, na barbela e músculo, confirmaram que as amostras isoladas do edema das barbelas são de baixa virulência, pois nenhuma ave sucumbiu, mas também não foram imunizadas contra a doença.

O fato de terem sido isoladas 3 amostras de *P. multocida*, de muco da fenda palatina de aves com edema da barbela, sugere a possibilidade de incriminar-se essas aves portadoras, como responsáveis pelo aparecimento e persistência da afecção numa criação, pois água e ração constantemente são contaminadas pela aves que mantem a *P. multocida* no muco da fenda palatina.

EDEMA EXPERIMENTAL — A inoculação de *P. multocida* na barbela de 77 galos normais, com amostras isoladas de edema, não reproduziu a afecção com a evolução completa, tendo sido observado, somente, aumento de temperatura e pequeno espessamento das barbelas inoculadas bem como ausência de mortes das aves inoculadas. Essas alterações podem ser comparadas às lesões iniciais que Csonotos (3) considerou como infiltração edematosa.

O fato de ter sido obtido 100% de lesões iniciais, nas aves inoculadas com a amostra 27, e somente 10 a 20% com as outras amostras, parece estar ligado à virulência da referida amostra, pois, logo após ter sido isolada, foi inoculada nas barbelas, enquanto as outras amostras, antes de serem inoculadas, sofreram repiques, o que determinou uma diminuição na virulência das mesmas tornando-as incapazes de reproduzirem lesões iniciais em 100% das aves inocula-

das. A LD 50% da amostra 27 quando inoculada nas barbelas era de 1: 25.000, e dois meses após a LD 50% baixou para 1: 3.500.

Aliás Csontos (3) admite que nos casos em que não conseguiu obter edema, com a inoculação de *P. multocida*, foi conseqüente a diminuição da virulência ou resistência das aves.

Não é concludente a experiência feita por DAVIS (4) que conseguiu reproduzir o edema e não verificou morte nas aves inoculadas, quando as amostras utilizadas por êsse autor deveriam ser virulentas, pois é na forma aguda da cólera, que se verificam casos de ruptura de gemas.

De outro lado a verificação feita por CARTER (2) e KJUR-MOURATOFF & ZAASJEDATELEVA (5), é favorável, pois êsses autores admitem que, conforme o tipo de *P. multocida*, se observa grande variabilidade na cólera aviária sobre o ponto de vista clínico, patológico e epizootológico.

Em face dos resultados obtidos por vários autores, juntamente com o que foi revelado neste trabalho, tudo faz crer que a reprodução experimental do edema da barbela está condicionada à virulência da *P. multocida*.

Como a virulência da *P. multocida* é muito variável, naturalmente existe uma graduação de virulência nas diversas amostras. Dêsse modo, teremos amostras de virulência elevada, responsáveis pela forma epizootica, como também encontraremos amostras praticamente avirulentas.

Desta maneira, tratando-se de amostra de virulência elevada, isolada de aves que foram atacadas pela forma aguda da moléstia, o edema será reproduzido, apresentando tôda a evolução e as aves inoculadas poderão sucumbir ou não, como foi verificado por CARPENTER (1), DAVIS (4), CSONTOS (3) e SZYFRES & TRENCHI (14), REIS & NÓBREGA (11) e no presente trabalho.

Tratando-se porém de amostras de menor virulência, conseqüentemente, observaremos reprodução do edema sem morte de ave, como foi verificado por LESBOUYRIES & BERTHELON (6) e SZYFRES & TRENCHI (14). Caso a virulência seja menor somente lesões iniciais serão verificadas, e, finalmente, tratando-se de amostras avirulentas, não haverá sequer as lesões iniciais, como ficou demonstrado com as inoculações levadas a efeito com a amostra 109 T que, obtida em laboratório por passagens sucessivas duma amostra fluorescente, vem sendo conservada há mais de 20 anos.

CONCLUSÕES

1) O presente trabalho revela a existência de aves com edema da barbela, como única manifestação da cólera aviária, na ausência das formas epizootica e enzoótica da moléstia.

2) As amostras de *P. multocida* isoladas dos edemas são de baixa virulência e, quando inoculadas nas barbelas de aves normais, reproduzem somente as lesões iniciais do edema, não provocando mortes, o que também se verifica, quando inoculadas intramuscularmente.

3) Em face dos resultados obtidos por vários autores, juntamente com o que foi revelado neste trabalho, tudo faz crer que a reprodução experimental do edema da barbela está condicionada à virulência da *P. multocida*.

4) O fato de terem sido isoladas 3 amostras de *P. multocida*, do muco da fenda palatina de aves com edema da barbela, sugere a possibilidade de incriminar-se essas aves, como responsáveis pelo aparecimento e persistência da afecção na criação.

5) A inoculação de amostra virulenta de *P. multocida*, na barbela de aves normais, reproduz o edema com evolução completa, bem como cria portadores da cólera aviária.

THE EDEMA OF THE WATTLES AS ONLY EVIDENCE OF FOWL CHOLERA AND THE EXPERIMENTAL STUDY OF THE DISEASE

Abstract

This study shows the edema of the wattles as the only evidence of fowl cholera in the absence of the epizootic and enzootic forms of the disease.

*The virulence of the samples of *P. multocida* isolated from the edemas, in the above conditions, is low and they induce only the initial lesions of the affection and are not lethal to the fowl injected in the wattles or intramuscularly.*

*In view of the results obtained by several authors and of our own experience, we are led to believe that experimental reproduction of the edema is dependent on the virulence of the sample of *P. multocida*.*

*Birds with the affection and which harbour *P. multocida* in their palatine cleft may have a role both in the dissemination and in the persistence of the disease.*

The inoculation of virulent samples of P. multocida in the wattles of normal fowl causes edema with complete evolution and originates carriers of the fowl cholera.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — CARPENTER — 1920 — Cit. in DAVIS 1924-25 — *Jour. Am. Vet. Med. Ass.* 19: 588.
- 2 — CARTER — 1952 — *Can. J. Comp. Med.*, 16: 150. Cit. in REIS & NÓBREGA — Tratado de Doenças das Aves — 2.^a Ed., Edições Melhoramentos, 1955, Vol. 2, p. 205.
- 3 — CSONTOS, J. — 1930 — Über eine seltenere Form der Geflügelcholera (Läppchenkrankheit). *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, 33: 417.
- 4 — DAVIS, D. E. — 1924-25 — Edema of the Wattles in Cockerels. *Jour. Am. Vet. Med. Ass.*, 19: 588.
- 5 — KJUR-MOURATOFF & ZAASJEDATELEVA — 1937 — All Union Inst. Poult Ind., U. S. S. R., 3: 145.
- 6 — LESBOUYRIES & BERTHELON — 1935 — Abcés pasteurelliques chez les oiseaux. *Bull. Acad. Vet. de France*, 8: 53.
- 7 — NÓBREGA, P. & BUENO, R. C. — 1944 — Sobre o reconhecimento de portadores na cólera aviária. *Arq. Int. Biol.*, São Paulo, 15: 339.
- 8 — NÓBREGA, P. & BUENO, R. C. — 1950 — Influência da temperatura na conservação da viabilidade e virulência da *P. multocida*. *Bol. Soc. Paulista Med. Vet.*, 8 (4): 189.
- 9 — NÓBREGA, P. & REIS, J., — 1938 — Vacinação contra cólera aviária com amostra viva (tipo azul) de *P. multocida*. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 9: 77.
- 10 — REED, L. J. & MUENCH, H. — 1938 — A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. Jour. Hyg.* 27: 493.
- 11 — REIS, J. & NÓBREGA, P. — 1936 — Doenças das Aves (Tratado de Ornitopatologia). Ed. do Inst. Biol. São Paulo, p. 158.
- 12 — REIS, J. & NÓBREGA, P. — 1937 — Sobre o reconhecimento de portadores na cólera aviária e a persistência de *P. multocida* nesses animais. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 8: 183.
- 13 — SEDDON, H. R. — 1914 — Oedema of the Wattles of Fowls due to an Organism of the pasteurella Group. *Vet. Jour.* 21: 24.
- 14 — SZYFRES, B. & TRENCHI, H. — 1948 — Enfermedad de Las Barbillas. (Abscessos Pasteurêlicos de las Barbillas). *Boletim Mensual la Dirección de Ganaderia*, Direccion de Ganaderia, Min. de Ganad. y Agric. Republica Oriental del Uruguay.

A “CERCOSPORIOSE” DA BANANEIRA
SUA OCORRÊNCIA NO ESTADO DE SÃO PAULO — EXPERIÊNCIAS E
COMBATE

POR

H. F. Pereira, E. R. de Figueiredo Jr. e J. Hussni
Do Instituto Biológico de São Paulo

Com as estampas 11 a 19

HISTÓRICO

A “cercosporiose” da bananeira, conhecida desde 1902, foi assinalada por Zimmerman em material procedente de Buitenzorg, na ilha de Java. Seus danos, porém, só se tornaram conhecidos em 1913, pelos prejuízos causados na província de Sigatoka, nas ilhas Fiji.

Em 1934 o mal foi assinalado pela primeira vez nas Américas, na ilha de Trinidad, sendo logo a seguir encontrado em outros pontos desse continente, nas Antilhas, América Central, etc..

Em 1935, um dos autores, então servindo junto ao Posto de Defesa Sanitária Vegetal no Porto de Santos, erradicou algumas touceiras de Gros Michel (*Musa sapientum*), provenientes de mudas importadas pela S. A. Frigorífico Anglo e plantadas na fazenda São Sebastião no município de Caraguatatuba, nas quais se manifestou o mal durante a quarentena a que foram submetidas.

Segundo BENTO DANTAS, só em 1944 se teve conhecimento da sua ocorrência enfitótica no Brasil, por estudos que DESLANDES realizou em material da Amazônia.

Em fins de 1952 fomos informados que CHARLES ROBBES havia assinalado a *Cercospora musae* em bananeiras da variedade ouro (*Musa sapientum*), em Jacarepaguá, no Rio de Janeiro.

No dia 18/11/1952 por solicitação do Sr. Agrônomo Regional de Santos, DR. REINALDO AZZI, foi inspecionado o bananal do sítio “Aratuã”, situado na Vargem Grande, município de Guarujá, de

propriedade da Sra. Lídia Guimarães Castro. Esse sítio era formado com cerca de 30.000 touceiras da variedade "Nanica" (*Musa cavendishii*), das quais 25.000 tratadas, inclusive adubadas com torta de algodão, e 5.000 parcialmente abandonadas.

De acôrdo com a informação dada, o bananal estaria sendo atacado por uma doença que seria causadora de regular estrago. Na inspeção à propriedade, após o exame de várias plantas doentes, verificamos tratar-se, pelos sintomas que apresentavam, de uma infecção de murcha bacteriana (*Bacterium solanacearum*), e para exame de laboratório foi colhido abundante material doente.

No intuito de ser efetuada uma inspeção mais completa, foram examinadas cuidadosamente outras touceiras. Nessa ocasião foi observada uma planta cujas folhas apresentavam manchas, diferentes das "manchas comuns das folhas" (*Cordana musae*, *Helminthosporium torulosum*, etc.). Já se suspeitando do que poderia ser, foram examinadas outras bananeiras que apresentavam as mesmas manchas. Foi colhido abundante material de folha com essas manchas, e examinado no laboratório do antigo Pôsto de Defesa Sanitária Vegetal do Ministério da Agricultura, havendo sido então por nós constatado o fungo *Cercospora musae* ZIMM., confirmando nossas suspeitas. A seguir foi enviado abundante material atacado para o laboratório da Seção de Fitopatologia do Instituto Biológico de São Paulo, onde foi confirmado o resultado do nosso exame. Estava assim o mal presente no Estado de São Paulo.

O então Diretor Geral daquele Instituto, DR. AGESILAU BITANCOURT, cientificado do ocorrido, convocou incontinentemente uma reunião, da qual participaram vários técnicos estaduais e alguns federais, dentre eles o DR. EUGÊNIO GERMANO BRUCK, Chefe do antigo Pôsto de Defesa Sanitária Vegetal do Ministério da Agricultura, em Santos, com quem trabalhamos em acôrdo há cerca de 20 anos. Nessa reunião, fizemos uma exposição detalhada daquela inspeção e de outras que logo a seguir já havíamos realizado, nas quais foi também constatada a presença da enfermidade. Nessa ocasião foram assentadas as bases do trabalho que deveria ser executado, cuja medida inicial foi o levantamento completo de tôda lavoura de banana

do Estado, principalmente as do litoral, onde estão instaladas cerca de 80% das culturas.

Uma comissão, composta pelos Engs. Agros. EDUARDO RODRIGUES DE FIGUEIREDO JR., ALCEU OSIAS MARTINS, EUGÊNIO GERMANO BRUCK e HYDER FREIRE PEREIRA, estudou e redigiu a minuta da portaria que no dia 23/7/1953 foi enviada ao Sr. Ministro da Agricultura pelo então Secretário da Agricultura do Estado de São Paulo, DR. JOÃO PACHECO E CHAVES. Nessa portaria era declarada zona infectada pelo fungo *Cercospora musae* ZIMM. a região do litoral paulista; era proibida a saída, da zona infectada para outras em que não tivesse sido assinalada essa doença, de mudas, pseudo-caules, folhas de bananeiras e de outros vegetais, veículos e instrumentos agrícolas e objetos outros que pudessem disseminar o mal; era determinada a obrigatoriedade da execução das medidas de combate e erradicação nos bananais atacados; e era dada competência ao Instituto Biológico para fazer executar as medidas necessárias ao bom e fiel cumprimento da citada portaria.

Coube-nos a árdua tarefa de executar os trabalhos de levantamento, tendo como auxiliares 3 engenheiros agrônomos e cerca de 50 fiscais, que foram preparados para essa função. Mais tarde nos atribuíram a responsabilidade das experiências de campo e combate.

Organizado o plano de trabalho, iniciamos imediatamente o levantamento fitossanitário das áreas atacadas, tendo sido visitados mais de 2.000 bananais contendo mais de 30 milhões de plantas, situados em todos os municípios do litoral do Estado, compreendidos entre as fronteiras dos Estados do Rio e Paraná, além de alguns bananais do interior, na zona do planalto, onde, diga-se de passagem, o único que apresentava o mal, em diminuta percentagem, foi destruído pela geada.

O levantamento revelou a ocorrência do "Mal de Sigatoka" em 32,5% dos bananais inspecionados, com infecções que variavam de 0,2% a 98%.

FICHA N.º 1

Modêlo da "Ficha de Inspeção" de campo, utilizada nos levantamentos

DEPARTAMENTO DE DEFESA SANITÁRIA DA AGRICULTURA
SECÇÃO DE FISCALIZAÇÃO FITOSSANITÁRIA

FICHA DE INSPEÇÃO

Proprietário N.º de ordem
Propriedade Área Município
Enderço postal Localidade
Doença Época em que foi notado o ataque
que Dia Mês Ano

Percentagem de pés atacados

Intensidade do ataque

N.º DE BANANEIRAS													
VARIEDADE													
		10 %	20 %	30 %	40 %	50 %	60 %	+ de 60 %	FRACO	REGULAR	FORTE	BEM FORTE	
.....	NANICA	☐											
.....	NANICÃO	☐											
.....	OURO	☐											
.....	BRANCA	☐											
.....	OUTRAS	☐											

Idade das plantas Tratos culturais

Procedência das mudas Roçada ☐ Desbastes ☐

Reforma das valas Material para exame

SOLO ¹ ☐ ² ☐ ³ ☐ ⁴ ☐ Adubações Lixo ☐ Outras ☐

- ¹
☐ Silicoso
²
☐ Argiloso
³
☐ Humoso
⁴
☐ Outros

OBSERVAÇÕES

VISTO:

Funcionário

Data

Proprietário ou Responsável

.....

[illegible]

TRATAMENTO CONDUZIDO		KEY S O R T MARCA REGISTRADA Nº 84.119
INDICADO POR		
MATERIAL DO DEPARTAMENTO UTILIZADO		DEPARTAMENTO DE DEFESA SANITÁRIA DA AGRICULTURA LEVANTAMENTO FITOSSANITÁRIO DA CERCOPORIOSE DA BANANEIRA FICHA DE INSPEÇÃO
OBSERVAÇÕES		
ASSINATURA DO FUNCIONÁRIO	DATA	
ASSINATURA DO PROPRIETÁRIO OU RESPONSÁVEL		
CASA ODEON LTDA. DEP. MOBEE MOD. 346		

Concluído o levantamento iniciamos as experiências de combate à doença.

Em 27/7/1953 fizemos o primeiro ensaio de polvilhamento, usando uma mistura de pó-cáfare, enxofre e talco, na proporção 20-30-50, respectivamente. Foram polvilhados 1.100 pés, tendo sido gastos 25 quilos da mistura, isto é, 22,7 gramas por pé. Foi êsse um ensaio preliminar para uma experiência de maior envergadura, a qual teve lugar no dia 29/7/1953, isto é, dois dias após o primeiro ensaio, no sítio "Trindade", da S. A. Frigorífico Anglo. Usamos um avião preparado para tal fim, com piloto especializado nessas operações. Nêsse trabalho foram empregados 900 quilos da mistura já mencionada para 5 alqueires de chão plantado, ou sejam 11.500 pés de bananeiras.

A operação em si teve uma execução perfeita, havendo o pó aderido muito bem em ambas as páginas das folhas. Entretanto, com a continuação dêsse tratamento em bananeiras do sítio "Caneleira", onde instalamos o primeiro "Campo de Demonstração", verificamos sua ineficácia no contrôlo do mal, razão pela qual tivemos de abandoná-lo.

IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

De um modo geral a "Cercosporiose" é uma doença muito séria para a bananeira, causando algumas vezes prejuízos totais, como ocorreu em países do norte da América do Sul, particularmente na Colômbia, e na América Central, Antilhas, Ilha de Fiji, etc..

Quando surgiu entre nós em 1952, produziu grande pânico, pois todos sabíamos da sua periculosidade, ainda mais pelo fato de atacar tôdas as variedades, mostrando-se mais virulenta exatamente naquelas que têm preferência dos mercados consumidores.

Felizmente, porém, o nosso grande receio foi até certo ponto infundado, graças à variedade que cultivamos em larga escala — a Nanica (*Musa cavendishii*) — que tem resistido galhardamente aos efeitos produzidos pelo mal, demonstrando a sua grande resistência. As vezes notamos ataques que podem ser considerados como graves, porém, com a mudança da estação e ao emitir novas folhas, a planta reage e reduz consideravelmente a infecção. A bananeira "Nanica" quando cuidada, sobretudo adubada, embora atacada pela "Cercosporiose", ainda produz bons cachos.

O que nos tem chamado a atenção é que, de um modo geral,

o cacho da banana produzido por uma planta doente, oferece pouca resistência a outras enfermidades que, em situação normal de uma planta sadia, pouca importância teriam.

A DOENÇA

A doença conhecida como “Mal de Sigatoka” — “Sigatoka disease” — é produzida pelo fungo *Mycosphaerella musicola* LEACH, nome da forma perfeita do ascosporo, pertencente ao fungo conhecido na sua forma conidiana como *Cercospora musae* ZIMM., descrito em 1902, em Java. E’ nessa forma imperfeita que o fungo é geralmente encontrado nas plantas doentes, sendo muito difícil encontrar-se a forma perfeita.

Baseados nas observações que fizemos no progresso da disseminação da doença nos bananais do litoral do Estado de São Paulo, somos de opinião que os esporos conidianos são levados pelo vento e com o auxílio da chuva, orvalho, etc., espalhados pelas folhas.

Tendo o fungo infectado a folha da bananeira, começam a aparecer sintomas que, segundo BENTO DANTAS, podem ser divididos em cinco fases, de acôrdo com suas evoluções.

Vamos resumir aqui as cinco fases em que BENTO DANTAS (1948) divide a evolução dos sintomas:

1.^a FASE — “CLOROSE” — Após 12 a 18 dias da inoculação do fungo, aparecem nas folhas numerosas manchas pontuadas, cloróticas, que se alongam no sentido paralelo das nervuras secundárias, até tomarem a forma de pequenas estrias amarelas, estrias essas de aproximadamente $\frac{1}{2}$ x 1 mm, isoladas e estéreis, perceptíveis a olho nú, por transparência, nas folhas de bananeira da variedade “Ouro”.

2.^a FASE — “NECROSE” — As estrias cloróticas continuam crescendo e, a partir do centro, começam a tomar uma cor pardo-avermelhada, que tende a escurecer até quase ao negro, após cerca de 10 dias. Embora continuem mais ou menos lineares, essas manchas começam a se alargar, medindo de 6 a 8 mm x 2 a 3 mm, são estéreis e muitas vezes envolvidas por um fino halo.

3.^a FASE — “MANCHA BRANCA” — Alguns dias após a zona central da mancha começa a ficar mais clara, até tomar uma coloração branco-sujo. A área central torna-se branca e deprimida, circundada por um bordo pardo-escuro não deprimido. Nessa fase, a mancha tem a forma biogival, medindo de 8 a 15 mm x 3 a 5 mm. Na

parte da mancha branca, observam-se com pequeno aumento, e às vezes a olho nú, inúmeros corpúsculos escuros, isolados, que são as frutificações dos fungos.

4.^a FASE — “CONFLUÊNCIA” — Quando há um grande número de manchas individuais numa mesma área da folha, com o desenvolvimento dessas ou pelo aparecimento de novas na mesma área, dá-se a coalescência, originando-se uma grande mancha pardo-clara, na qual ficam delineados os contornos das manchas individuais.

Normalmente, em plantas de um ano, observam-se confluências a partir da 5.^a folha, a contar do centro (coração), enquanto em plantas mais velhas essas confluências são assinaladas já na 3.^a folha.

5.^a FASE — “PREMATURAÇÃO DOS FRUTOS” — Em cultura intensiva das variedades mais suscetíveis, como no caso da variedade “Ouro”, a confluência se verifica desde as folhas mais novas, devido ao grande número de infecções motivadas pela abundância de inóculo. Disso resulta que a planta, com todo seu sistema foliáceo seriamente prejudicado, fica sem meios para transformar grande parte dos alimentos retirados do solo, advindo como consequência a produção de cachos de tamanho reduzido, com frutos raquíticos, que amadurecem prematuramente, de polpa descolorida e quase sem paladar.

PATOGENIA

O esporo levado pelo vento adere à superfície da folha, germinando nas gotas de orvalho ou de chuva ali existentes. O tubo germinativo infectante penetra através dos estomas, alcançando as células hipodérmicas e iniciando sua destruição, cuja consequência resulta na formação de manchas pontuadas, seguindo-se as estrias amarelas, aproximadamente 12 a 18 dias depois. Essas manchas e mesmo as estrias, quando ainda muito no início, não podem ser vistas a olho desarmado nas folhas da bananeira “Nanica”, ou “Nanicão”, porém são perfeitamente perceptíveis nas folhas da bananeira “Ouro”, por transparência, quando essas são colocadas contra o sol.

Avançando na sua marcha, o inóculo prossegue no seu processo de infecção através das células dos parênquimas paliádico e lacunoso e das células epidérmicas vizinhas, observando-se nessa ocasião o colapso e branqueamento da área central da mancha, produzindo grande quantidade de conídias.

O período do desenvolvimento do esporo é variável, porém Tipler dá como termo médio de 35 a 40 dias.

A infecção conidiana produz-se principalmente na face inferior da folha central, nas superfícies marginais relativamente pouco cerosas, quando a folha ainda enrolada, formando manchas que aparecem em forma de linhas paralelas ao bordo esquerdo, que é o único exposto durante a maior parte do período de desenrolamento ou abertura. Depois da folha aberta, algumas dessas manchas aparecem em forma de diagonal no sentido da nervura central. Essas manchas são conhecidas com o nome de “mancha linear”, e são bem características.

Os esporos da forma perfeita, uma vez expelidos do corpo de frutificação vão atingir as pontas das folhas novas, quando já abertas, formando a chamada “mancha da ponta”.

Muito embora a mancha da folha da bananeira aparentemente não retarde o desenvolvimento da folhagem, tem a faculdade de reduzir as reservas da planta, uma vez que diminui a superfície efetiva da folha, além de provocar a morte prematura da mesma no caso dos ataques mais intensos.

RESISTÊNCIA DAS VARIEDADES

As variedades de bananeira cultivadas são tôdas mais ou menos suscetíveis à “Cercosporiose”. Em algumas a doença age com mais virulência, noutras de forma mais benigna. Baseado nas fases que o mal possa determinar numa variedade, poderá ser estabelecida a seguinte classificação:

- 1) “*Imune*” — quando não existe nenhum sintoma do mal.
- 2) “*Altamente resistente*” — no caso da 1.^a e 2.^a fase, isto é, aparecimento das estrias cloróticas ou necróticas, porém sem esporulação.
- 3) “*Resistente*” — quando aparece a mancha branca, isolada, com esporulação, isto é, 3.^a fase.
- 4) “*Suscetível*” — quando ocorre a confluência das manchas brancas, ou seja a 4.^a fase.
- 5) “*Altamente suscetível*” — no caso das manchas brancas confluírem já nas folhas mais novas, com a prematuração dos frutos, isto é, 5.^a fase.

O "Abacá" (*Musa textilis*) é considerado imune na Amazônia.

As variedades "branca" e "pacovão" (*Musa sapientum* L.) são consideradas resistentes.

A banana "baé" (*M. Cavendishii* LAMB) e tôdas as demais variedades da *M. sapientum*, a saber: "prata", "roxa", "S. Tomé" e "Inajá" são consideradas suscetíveis.

Nas condições do litoral do Estado de São Paulo, já hoje podemos considerar a variedade "Nanica" como suscetível, porém oferecendo uma apreciável resistência aos efeitos produzidos pela doença. Grande é a capacidade de recuperação dessa variedade, quando são dispensados ao bananal certos cuidados culturais, como: limpeza das valas de drenagem (nos bananais de várzea), capina, desbastes das folhas velhas, adubação, etc..

Verdade é que uma bananeira, cujo ataque pela "Cercosporiose" possa ser classificado como regular, produz cacho de bom tamanho, com frutos de desenvolvimento quasi normal, no caso de ter recebido os tratos culturais necessários, inclusive adubação, embora não tenha sido executado nenhum tratamento contra a doença. Os frutos, porém, geralmente sofrem uma prematuração, a polpa adquire uma coloração creme pálido, quase esbranquiçado sujo, com paladar pouco apurado. A resistência desses frutos é relativamente precária, começando a apodrecer, às vêzes, antes de completamente maduros.

Entre nós, nas condições do litoral, a variedade "Ouro" mostrou-se altamente suscetível, razão pela qual recomendamos sua eliminação, para não constituir foco permanente de inóculo.

Em alguns países os técnicos têm procurado obter híbridos resistentes à "Cercosporiose" e que apresentem boas qualidades para as exigências do comércio, porém, até o momento, desconhecemos que tenham conseguido uma variedade nessas condições.

O Imperial College of Tropical Agriculture de Trinidad estava estudando o híbrido denominado "IC", resultante do cruzamento da *Musa acuminata* x *Gros Michel*, híbrido êste considerado altamente resistente. Desconhecemos as conclusões finais sobre o mesmo e não temos nenhuma notícia do seu emprêgo em cultura de natureza econômica.

FATORES QUE FAVORECEM O AGENTE

Dentre os fatores que favorecem o desenvolvimento do mal, devem ser considerados a variedade cultivada, a temperatura, a umidade, a natureza do solo, além de outros que possam concorrer para o enfraquecimento da planta.

As variedades cultivadas têm grande importância, pelo fato de umas serem mais suscetíveis que outras. No nosso caso a variedade "Ouro", cultivada em condições ambientes absolutamente idênticas às da "Nanica", foi quase totalmente dizimada pelo mal, enquanto esta última tem demonstrado uma apreciável resistência.

A temperatura média para o melhor desenvolvimento do fungo é de 25 — 26° C, cessando seu desenvolvimento acima de 32° C. Nas condições do litoral paulista, nota-se bem esse fato. Ali a temperatura média de verão gira em torno de 35° C. Nessa época a atividade vegetativa é bem intensa, apresentando a planta um sistema foliáceo abundante, viçoso e relativamente limpo de manchas de *Cercospora*.

O fungo requer um mínimo de 80% de umidade relativa do ar para seu melhor desenvolvimento.

Temos notado que em solo muito ácido as plantas apresentam maior infecção.

Alguns autores defendem essa tese, de que o solo quanto mais ácido, mais favorece a infecção.

EXPERIMENTAÇÃO E COMBATE

Objetivando conhecer o melhor meio de controlar a "Cercosporiose" da bananeira, instalamos alguns campos experimentais, onde procedemos a ensaios com diversos fungicidas, além de adotarmos certas práticas culturais.

Dentro do programa inicial, constou a instalação de um campo em Caraguatatuba, na fazenda São Sebastião, um em Japuí, município de São Vicente e um em Caneleira, no município de Santos.

Pelas dificuldades surgidas (distância, meios de transporte, falta de auxiliares técnicos, etc.) fomos obrigados a abandonar o campo de Caraguatatuba. Foram mantidos os dois outros, isto é, o de Caneleira, onde eram feitas, além das experiências, demonstrações para os musicultores interessados, e o de Japuí.

Em ambos os campos foram executados os tratamentos culturais usados normalmente pelos musicultores (capinas, valas de drenagem, desbastes de folhas, destocamentos, etc.). No campo da Caneleira todo o bananal continuou sendo adubado com lixo da cidade, como era norma antiga de seu proprietário. Em Japuí suprimimos a adubação, vivendo o bananal às custas das reservas do solo durante todo o tempo das experiências, ou seja, durante 1 ano e seis meses.

Resumidamente diremos o que foi feito nesses dois campos e quais as conclusões a que chegamos.

CAMPO DE DEMONSTRAÇÃO DE CANELEIRA

No "Campo de Demonstração de Caneleira", o primeiro a ser instalado, as experiências tiveram início a 5 de agosto de 1953. Esse bananal foi cuidadosamente escolhido. Apresentava nessa ocasião 98% dos pés atacados, cuja infecção variava de 65 a 100% nas plantas. A sua produção em cachos exportáveis estava reduzida a cerca de 45% no máximo.

O bananal, que contava cerca de 6.000 pés, foi dividido em 5 quadras aproximadamente iguais, com as denominações de A, B, C, D e testemunha.

QUADRA A — tratada com pulverizações de Perenox na dosagem de 0,4%, utilizando-se como adesivo, para a metade dessa quadra, Sandovit a 0,2% e para a outra metade farinha de trigo também a 0,2%.

QUADRA B — tratada com Calda-bordalesa a 1:1:100.

QUADRA C — tratada com polvilhamentos da mistura de pó-cáfaró, e talco na proporção de 30-70, sendo abolido o enxofre da mistura inicial.

QUADRA D — tratada com Banacobre na dosagem de 0,4% no verão, e 0,25% no período mais frio (parte do outono, inverno e primavera).

Os tratamentos eram executados com um espaçamento que variava de 22 a 26 dias um do outro.

Como resultado dessas experiências chegamos à conclusão da ineficácia do polvilhamento com mistura do pó-cáfaró e talco, ou seja, nulo o resultado da quadra C.

QUADRA A. — Perenox a 0,4% — controle relativo do mal até o quinto mês, quando tivemos de abandonar as experiências com esse produto em virtude de não haver sido encontrado no comércio de São Paulo nem do Rio de Janeiro.

O Perenox, além da sua pouca eficiência, ainda apresentou os seguintes inconvenientes:

- a) não aderiu bem às folhas das bananeiras, principalmente na página inferior, apesar dos adesivos usados;
- b) difícil de ser encontrado à venda no mercado;
- c) de custo relativamente elevado, tornando a operação dispendiosa.

QUADRA B — A Calda bordalesa foi empregada sem adição de qualquer adesivo ou espalhante. O controle do mal progrediu acentuadamente a partir do quarto mês de tratamento, chegando ao final com apenas 0,5% de infecção.

QUADRA C — O emprêgo do pó-cáfaro e talco em polvilhamento na razão de 30-70 foi, de todos, o tratamento mais ineficaz no controle do mal, pois a infecção que era inicialmente de 98%, baixou apenas para 61%, tornando-se contra-indicado, muito embora apresentasse grande facilidade para aplicação e um custo econômico.

QUADRA D — O Banacobre foi um produto posto à nossa disposição pela Sandoz S. A.. Seu emprêgo foi muito satisfatório, ficando ligeiramente aquém da Calda-bordalesa. Também a partir do 4.^o mês já mostrava sua ação benéfica no controle do mal, chegando ao final dos trabalhos com um ótimo resultado, pois baixou a infecção de 98% para 3%. Sua preparação é muito fácil, não necessita de adesivos, pois já o possui em sua composição, adere bem às folhas e deixa uma tênue cor terrosa sobre a parte tratada. Requer, entretanto, cuidado na dosagem, de acordo com a temperatura ambiente, para não queimar as folhas.

Um fato deve ser destacado nêsse Campo Experimental. Nas quadras tratadas com Calda-bordalesa e Banacobre (B e D), após cerca de um ano de tratamento, a produção de cachos exportáveis, que oscilava numa média de 45%, passou a ser de 100%, deixando de haver descartes. Os cachos produzidos nessas quadras eram destinados à exportação para a Inglaterra ou Uruguai, países mais exigentes que a Argentina.

As pulverizações foram feitas com pulverizadores a motor, das marcas Dobbins, Matador e Espartan.

CAMPO EXPERIMENTAL DE JAPUÍ

Esse campo foi instalado no sítio “Japuí”, de propriedade do Sr. Adriano Dias dos Santos.

Possui essa propriedade cerca de 35.000 touceiras de bananeira, quase todas da variedade “Nanica”. Arrendamos do proprietário

um talhão com 240 touceiras onde as bananeiras apresentavam maior grau de infecção.

Dividimos o campo em 10 quadras, contendo 6 canteiros por quadra e 4 touceiras por canteiro. Dessa forma, cada quadra compunha-se de 24 touceiras e cada canteiro ou lote de 4 touceiras. Depois de balizarmos as quadras e os lotes, sorteamos os tratamentos para os lotes de cada quadra. Os produtos escolhidos para esse campo foram: Calda-bordalesa, Banacobre, Dithane Z-78, Nirit e Fermate.

Para facilitar o trabalho, sem perigo de confusão, convencionamos números e cores para os tratamentos a serem usados. Assim, os lotes testemunhas tomaram o número 1 e a cor convencional branca; o lote 2 coube à Calda-bordalesa, com a cor azul; o 3 ao Banacobre, com a cor vermelha; o 4 ao Dithane Z-78, com a cor amarela; o 5 ao Nirit, com a cor cinza; e finalmente, o 6 ao Fermate, com a cor verde.

Os produtos foram usados na seguinte dosagem:

CALDA-BORDALESA — 1:1:100, adicionada com o adesivo Triton X-114 na dosagem de 0,2%. (O Triton é um espalhante adesivo à base de resina glicero-ftálica modificada).

O emprêgo desse espalhante-adesivo na Calda-bordalesa é de grande vantagem, porque a solução além de aderir bem espalha-se com grande uniformidade sobre a superfície das folhas de bananeira, apesar da superfície cerosa que esta apresenta.

BANACOBRE — Empregado a 0,3% durante o período compreendido entre o outono e primavera (período de temperaturas mais baixas), e a 0,4% no período de verão, quando as temperaturas são mais altas e as chuvas mais freqüentes.

Este produto dispensa a adição de molhante, por já o conter na sua composição. É um produto próprio para as doenças das folhas da bananeira, dentre elas a *Cercospora musae* ZIMM.. Adere bem às folhas, formando uma camada fina e uniforme sobre a superfície das mesmas. É de preparo fácil, e depois de preparado pode ser guardado, conservando-se bem por alguns dias.

DITHANE Z-78 — Empregado na dosagem de 0,24%, com adição de Triton B-1956 à razão de 0,03%.

NIRIT — Empregado na dosagem de 0,75%, com adição de Triton X-100 à razão de 0,03%. Esse adesivo apresentou o inconveniente de produzir muita espuma, o que dificultava a pulverização.

FERMATE — Empregado na dosagem de 0,3%, com adição de Triton X-114 à razão de 0,035%.

Em Japuí, as pulverizações tiveram início em 6 de junho de 1955 e terminaram em 20 de novembro de 1956, havendo, portanto, um período de experiências de 18 meses.

O intervalo médio entre as pulverizações foi de 28 dias.

Para determinar a percentagem da infecção na fôlha, adotamos a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de infecção} = \frac{\text{Soma das notas} \times 100}{\text{N.º de fôlhas} \times 4}$$

Para avaliarmos o grau de infecção existente foram convencionadas notas, que eram dadas baseadas na área de distribuição das manchas sobre a superfície de cada fôlha. Os valores correspondiam ao seguinte:

F	0 — sem lesões
O	1 — vestígios até 1/4 da superfície (25%)
L	2 — de 26% até 2/4 da superfície (50%)
H	3 — de 51% até 3/4 da superfície (75%)
A	4 — de 76% até 4/4 da superfície (100%)
S	

Além do grau de infecção da doença, procuramos controlar o grau de maturação do fruto e o número de pencas em cada cacho.

Para o julgamento da maturação do fruto, utilizamos o mesmo critério adotado pelos musicultores do litoral do Estado, isto é:

3/4 magra; 3/4 média (natural) e 3/4 gorda

No momento em que os cachos estavam em ponto de corte, fazíamos o julgamento do grau de infecção, da maturação do fruto e do número de pencas em cada cacho, constando todos êsses dados e mais qualquer outro elemento que se nos apresentasse digno de nota, como no caso de tombamento da bananeira, etc..

Os cachos colhidos eram guardados para acompanharmos o processo de maturação e resistência de conservação em meio ambiente.

Como exemplo do julgamento da infecção, damos abaixo o que foi feito na quadra II, lote n.º 1 (lote testemunha):

QUADRA II

Lote 1 — (testemunha)

$$\% \text{ de infecção} = \frac{13 \times 100}{4 \times 4} = 81,2\%$$

13 — corresponde à soma das notas atribuídas

100 — percentagem

4 — n.º de folhas existentes na bananeira

4 — fator fixo, pelo qual é multiplicado, no denominador, o número de folhas existentes na planta.

N.º de pencas = 10

Maturação = 3/4 média.

RESULTADOS DOS TRATAMENTOS

Os resultados dos tratamentos foram bastante animadores, destacando-se entre os fungicidas testados a Calda-bordalesa, em primeiro lugar, seguida de perto pelo Banacobre.

Os demais fungicidas tiveram efeito bastante inferior, razão pela qual não deverão ser indicados para o controle do "Mal de Sigatoka".

No quadro n.º 1 poderão ser observados em detalhes os resultados obtidos na experiência realizada.

QUADRO N.º 1

Quadro sumário dos resultados, representando o número de touceiras cortadas, cujas folhas foram observadas e julgadas dentro da fórmula: % de infecção = $\frac{\text{Soma das notas} \times 100}{\text{N.º de folhas} \times 4}$, e a percentagem média de ataque do fungo *Cercospora musae* Zimm. em cada repetição.

TRATAMENTOS		R E P E T I Ç Õ E S																TOTAL					
		I		II		III		IV		V		VI		VII		VIII		IX		X			
		% MÉDIA		N.º de cortes		% MÉDIA		N.º de cortes		% MÉDIA		N.º de cortes		% MÉDIA		N.º de cortes		% MÉDIA		N.º de cortes		% MÉDIA	
		N.º de cortes	% MÉDIA	N.º de cortes	% MÉDIA	N.º de cortes	% MÉDIA	N.º de cortes	% MÉDIA	N.º de cortes	% MÉDIA	N.º de cortes	% MÉDIA	N.º de cortes	% MÉDIA	N.º de cortes	% MÉDIA	N.º de cortes	% MÉDIA	N.º de cortes	% MÉDIA	N.º de cortes	% MÉDIA
1	8	60,8	5	80,5	8	76,7	6	74,0	9	72,9	8	74,0	6	52,8	8	76,5	5	76,3	10	77,3	73	72,3	
2	9	31,8	4	20,2	8	26,5	6	26,5	10	27,8	6	24,3	7	21,8	9	23,2	7	29,1	4	24,2	70	26,1	
3	8	24,3	6	25,7	8	35,8	7	28,4	9	32,5	7	22,7	8	27,4	7	29,3	6	32,3	6	27,6	72	28,7	
4	11	37,4	4	39,4	10	40,3	10	45,4	7	48,2	8	32,0	9	32,4	6	25,2	5	49,9	4	38,8	74	38,7	
5	10	56,6	5	67,3	6	69,7	8	57,5	5	49,2	4	72,0	5	36,4	3	31,2	4	77,7	7	51,3	57	57,2	
6	8	42,9	9	43,3	9	47,2	6	51,3	7	51,7	8	43,3	7	38,8	10	21,8	6	62,8	6	46,9	76	43,7	

TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS RESULTADOS

Pela análise de variância (SNEDECOR 1946) dos dados transformados em arco seno $\sqrt{x}$, verificou-se um efeito altamente significativo dos tratamentos sobre a infecção da folhagem.

Com base nesta análise, os fungicidas podem ser classificados em 3 grupos: no 1.º grupo, com melhor proteção da folhagem, estão os tratamentos 2 e 3, não havendo diferença significativa entre eles; no 2.º grupo, com eficiência intermediária, estão os tratamentos 4 e 6, não havendo diferença entre ambos, mas diferindo significativamente dos tratamentos do 1.º grupo; no 3.º grupo, com resultados inferiores, estão os tratamentos 5 e 1, sendo que o n.º 1, corresponde aos lotes testemunhas, que não receberam tratamento.

O comportamento dos fungicidas experimentados se acha ilustrado no quadro n.º 2. Pelo exame do referido quadro pode-se concluir que a Calda-bordalesa teve melhor comportamento que os demais fungicidas, num nível altamente significativo, quanto à proteção da folhagem, ligeiramente superior ao Banacobre, que foi o que mais se lhe aproximou.

QUADRO N.º 2

Representação gráfica da significação estatística das diferenças entre o efeito de diversos fungicidas na proteção da folhagem. A média é a porcentagem de infecção transformada em arco seno $\sqrt{x}$

(1)						59,89 TESTEMUNHA
(5)	++					49,70 NIRIT
(6)	++	++				41,25 FERMATE
(4)	++	++	—			38,35 DITHANE
(3)	++	++	++	+		32,17 BANACOBRE
(2)	++	++	++	++	—	30,33 CALDA-BORDALESA
	1	5	6	4	3	2
						D 1% 7,12
						D 5% 5,36

Este gráfico foi construído dispondo-se os diferentes tratamentos na vertical, em ordem decrescente de cima para baixo, e na horizontal em ordem crescente da esquerda para a direita. Obtém-se o grau de significação estatística entre dois tratamentos da seguinte maneira: procura-se na horizontal o número relativo ao tratamento de menor infecção e segue-se a faixa correspondente em direção ascendente até encontrar a faixa que parte do eixo vertical, relativa ao outro tratamento. No quadrado, assim constituído, representativo de ambos os tratamentos, encontra-se um dos sinais convencionais: (—) indica não haver diferença significativa; (+) diferença significativa no nível fiducial 5% e (++) diferença altamente significativa no nível fiducial 1%.

Os resultados finais conseguidos com Calda-bordalesa e Banacobre no sítio “Caneleira”, foram mais positivos do que os obtidos no Campo do “Japuí”. Perfeitamente justificável essa diferença. Enquanto no campo de “Caneleira” foram tratados todos os pés (cêrca de 6.000), com os diferentes produtos utilizados, no campo do “Japuí” só foram consideradas 240 touceiras, que se achavam encravadas no centro de cêrca de 35.000 touceiras. No campo de “Caneleira”, onde tôdas as bananeiras foram tratadas, houve um mínimo de possibilidade para a multiplicação do inóculo e, conseqüentemente, as novas infecções tornaram-se muito limitadas; entretanto, no campo de “Japuí” existiam, além das testemunhas, cêrca de 34.760 touceiras sempre produzindo novos esporos, constituindo-se dessa maneira num manancial permanente de inóculos.

MEDIDAS DE CONTRÔLE

a) Uma das primeiras providências a tomar deve ser a escolha da variedade, evitando-se o cultivo das variedades altamente suscetíveis, como “Ouro”, “Prata”, “Gros Michel”. Pelo que a prática vem demonstrando, a “Nanica”, embora suscetível, apresenta bom índice de resistência, pelo menos nas condições ecológicas do litoral paulista. Com um sistema adequado de pulverização, o mal deixará de constituir problema. Outra variedade que vem apresentando uma relativa resistência é a “Congo”.

b) As mudas a serem plantadas devem proceder de zona onde ainda não exista o mal.

c) Todos os focos de disseminação devem ser eliminados, ou seja: arrancar e destruir tôdas as touceiras das variedades altamen-

te suscetíveis; queimar tôdas as fôlhas provenientes dos desbastes, etc..

d) Fazer pulverizações com Calda-bordalesa, na proporção de 1:1:100 (1 quilo de sulfato de cobre, 1 quilo de cal virgem para 100 litros de água). No inverno as pulverizações devem ser feitas com menor espaçamento, isto é, com intervalo de 3 semanas uma da outra. No verão êsse intervalo poderá ser de 4 semanas, ou até 30 dias.

Na aplicação da Calda-bordalesa, devem ser observados com rigor os cuidados a serem tomados na sua preparação, seguindo com atenção as instruções, pois uma calda mal preparada dará um resultado completamente diverso.

Recomendamos misturar o adesivo Triton X-114, na razão de 0,02%.

Desaconselhamos o desbaste severo das fôlhas nas plantas doentes, por ser essa uma medida quase ineficaz no contrôle do mal, trazendo para a planta e para o cacho mais danos do que vantagem. Entre outras razões, é prejudicial porque mutila muito a planta, deixando-a bastante debilitada, e expõe os cachos aos raios diretos do sol, ficando dentro de 12 horas completamente queimados, uma vez que são cortadas as fôlhas que lhes serviam de proteção.

Outro tratamento que pode ser recomendado é a pulverização com Banacobre, na razão de 0,3% nas estações mais frias e menos chuvosas e na razão de 0,4% nos períodos chuvosos e quentes.

Os autores têm o prazer de consignar aqui os seus mais vivos agradecimentos aos DRS. ARMANDO CONAGIN, ANDERSON COELHO DE ANDRADE e EUGÊNIO GERMANO BRUCK pelo seu valioso auxílio na análise estatística dos resultados conseguidos, sugestões e estímulo com que foram distinguidos no decorrer dos trabalhos experimentais.

EXPERIMENTS TO CONTROL THE "SIGATOKA DISEASE" — CERCOSPORA MUSAE ZIMM — IN SÃO PAULO

Abstract

In this paper are reported the results of experiments with several fungicides, in order to control the "Sigatoka disease" — Cercospora musae Zimm. — affecting cultivated banana trees on litoral zone of São Paulo.

The experiments were performed with ten repetitions, in ten large groups. In each group there were 24 banana trees distributed in six plots with 4 trees, each one treated with a different fungicide.

Five fungicides have been tested: "Bordeaux mixture", "Banacobre", "Nirit", "Fermate" and "Dithane".

Bordeaux mixture spray showed high efficacy, giving the best control, followed by Banacobre, also with very good results.

The other fungicides, however, are not recommended for the control of the disease, according the bad performances observed.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — CUNHA, J. F. — 1948 — Cultura da Bananeira. Serv. de Inf. Agric., Minist. Agric., págs. 1-107.
- 2 — DANTAS, B. — 1948 — A ocorrência da "Cercosporiose" da bananeira no Brasil, *Cercospora musae* Zimm. *Bol. Tecn. do Inst. Agron. do Norte*, Belém, n.º 14, 29 págs..
- 3 — DESLANDES, J. A. — 1938 — Doenças da Bananeira. Publicação n.º 10, Serv. Def. Sanit. Vegetal, Dep. Nac. da Prod. Vegetal. Minist. Agric..
- 4 — ISSA, E. — 1953 — A "Cercosporiose" da Bananeira, *O Biológico*, 19 (4): 65-73.
- 5 — MARTYN, E. B. & Mc ILWAINE, A. — 1949 — Banana leaf spot disease Control in Jamaica. Bulletin n.º 46, Dep. of Agriculture, Jamaica, 19 págs., XVI plates.
- 6 — TIPLER, R. V. — 1949 — La Mancha de la hoja en el Bananero — La enfermedad y su control, *Rev. Fitopatol. Mundial*, 1 (2): 43-52.
- 7 — TOLLENAAR, D. — 1955 — The control of Sigatoka (Banana leaf spot disease) by mist-blowing with Banacobre-Sandoz. *Netherlands J. Agric. Sci.* 3 (1): 70-83.
- 8 — WARD, F. S. — 1938 — Cercospora leaf spot of Bananas. *J. Jamaica Agric. Soc.*, 42: 23-34. (Publicado também como Bulletin 15, Dep. Sci. Agric. Jamaica).
- 9 — WARDLAW, C. W. — 1935 — Diseases of Banana. MacMillan and Co., Ltda., London, págs. 285-296.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 11

Prancha colorida mostrando as lesões e os efeitos da doença em folhas de bananeira. Nas infecções mais intensas, as folhas secam totalmente.

Estampa 12

Fig. A — *Cercospora musae* ZIMM. — À direita: secção mostrando um tufo de conidióforos. À esquerda: conídias (Segundo Tropical Agriculture, in Wardlaw).

Fig. B — Vista panorâmica do "Campo de Demonstração de Caneleira". Note-se o viço das bananeiras tratadas.

Estampa 13

Fig. A — Entrada do "Campo de Demonstração de Caneleira".

Fig. B — Quadra A do "Campo de Caneleira". Exame de folhas tratadas com calda bordalesa.

Estampa 14

Fig. A — Pulverização no "Campo de Caneleira", com pulverizador motorizado "Dobbins" de 400 litros.

Fig. B — Outra fase de pulverização no mesmo campo, com pulverizador motorizado "Dobbins" de 80 litros.

Estampa 15

Fig. A — Abastecimento de um pulverizador "Dobbins" de 80 litros, no "Campo de Caneleira".

Fig. B — Quadra B, no "Campo de Demonstração de Caneleira", tratada com Banacobre.

Fig. C — Polvilhamento experimental com avião, no "Sítio Trindade" — Santos.

Estampa 16

Planta do "Campo Experimental do Japuí", onde foram feitos os testes dos fungicidas em competição.

Estampa 17

Fig. A — Vista de um trecho do "Campo do Japuí".

Fig. B — Cacho em formação, de bananeira tratada com calda bordalesa, no Japuí.

Fig. C — Bananeiras do "Campo Experimental do Japuí", tratadas com calda bordalesa.

Estampa 18

Fig. A — Pulverização de bananeiras do "Campo do Japuí", com pulverizadores costais.

Fig. B — Outra fase de pulverização no "Campo do Japuí".

Estampa 19

Fig. A — Exame, em laboratório, de cachos de bananas tratadas e não tratadas. Nestas últimas, podem ser observadas as podridões causadas por vários fungos.

Fig. B — Exame de cachos provenientes de bananeiras tratadas, todos saudáveis. O tratamento contra a *Cercospora musae* impediu a invasão de outros fungos.

CERCOSPORIOSE DA BANANEIRA



Folha colhida n.º 7

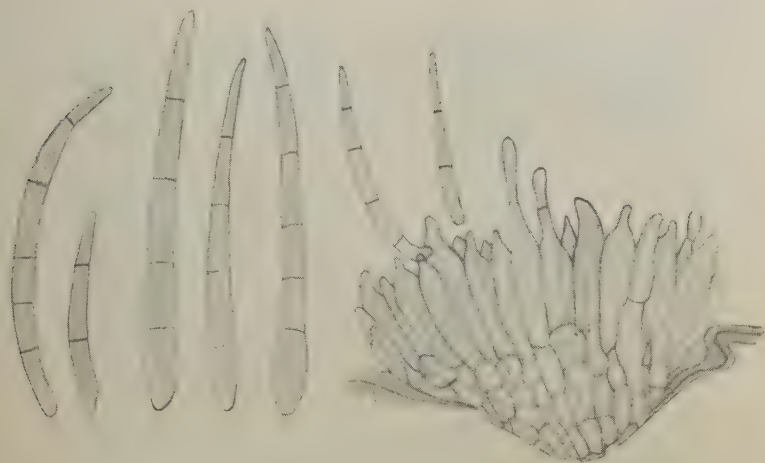


Fig. A



Fig. B



Fig. A



Fig. B



Fig. A



Fig. B

Fig. A



Fig. B

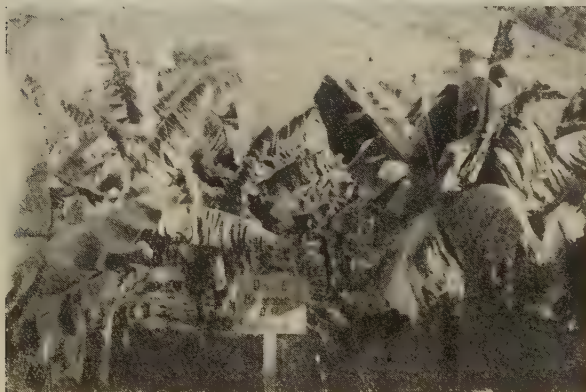
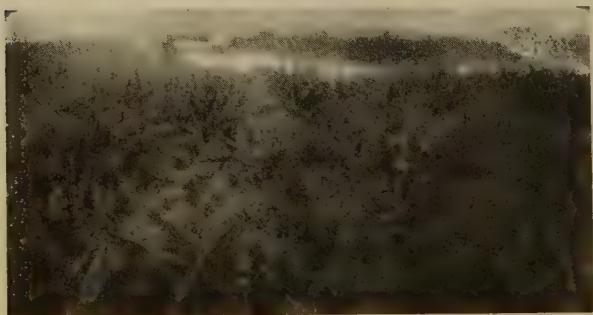


Fig. C



PLANO DO CAMPO EXPERIMENTAL
DO
JAPUÍ

QUADRA I

5	3	4
2	6	1

QUADRA II

6	1	3
2	4	5

QUADRA III

4	6	2
3	5	1

QUADRA IV

2	4
5	3
1	6

QUADRA V

4	6	5
2	3	1

QUADRA VI

6	4
3	2
1	5

QUADRA VII

6	2	5
1	3	4

QUADRA VIII

5	3	2
1	4	6

QUADRA IX

6	2	1
4	5	3

QUADRA X

4	6	5
3	1	2

CADA QUADRA COM
24 TOUCEIRAS
CADA LOTE COM
4 TOUCEIRAS

1-TESTEMUNHA-BRANCO
2-BORDOLEZA-AZUL
3-BANACOBRE-VERMELHO

4-DITANE-AMARELO
5-NIRIT-CINZA
6-FERMATE-VERDE

Fig. A



Fig. B



Fig. C

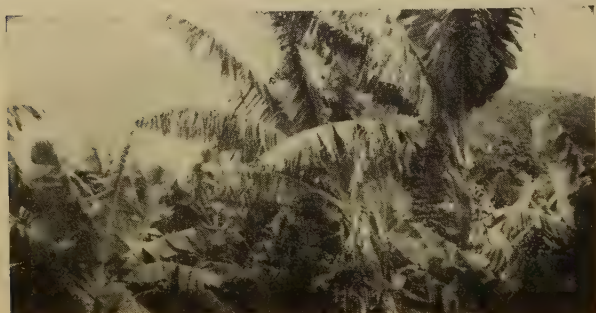




Fig. A



Fig. B



Fig. A

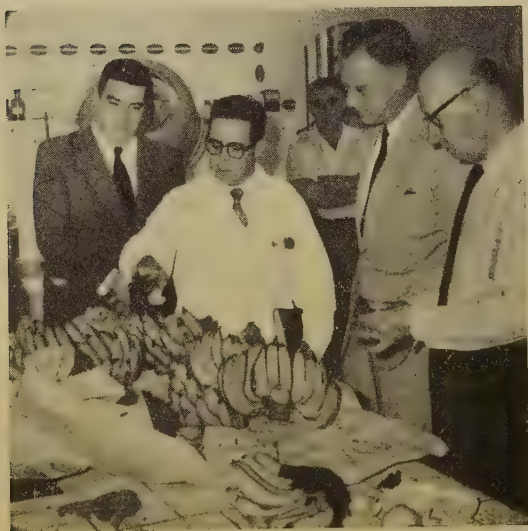


Fig. B

CONTRIBUIÇÃO À BIOGEOGRAFIA DOS TÉRMITAS DE SÃO PAULO, BRASIL

INSECTA — ISOPTERA (*)

POR

R. L. Araujo

Do Instituto Biológico de São Paulo

Com 1 mapa

"The study of the geographical distribution of insects... is still in an infant stage of development".

(GRESSITT, 1958: 207)

"A vast amount of detailed study remains to be done on the definition of the ranges of individual species, and exact knowledge of these is required to complete the foundation for zoogeographical investigation".

(ALLEE ET SCHMIDT, 1951: 5)

INTRODUÇÃO

Este trabalho — dedicado à memória de CÂNDIDO FIRMINO DE MELLO-LEITÃO, pioneiro dos estudos zoogeográficos e historiador dos fastos da Biologia no Brasil — consiste fundamentalmente em uma primeira lista faunística dos cupins do Estado de São Paulo, Brasil, a que se juntam dados ecológicos e outros.

A literatura registra para o Estado de São Paulo, 23 espécies, às quais adicionamos outras 22, precedidas na lista por um asterístico (*). Deixamos de incluir as espécies ainda inéditas que serão, todavia, mencionadas, em certos casos, para testemunharem a presença de seus gêneros na área considerada. Temos, pois, o total de 45 espécies e, considerada a pouca intensividade do colecionamento, as grandes áreas do Estado ainda não visitadas e as espécies indescritas, pode-se prever considerável aumento desse número, não obstante a crescente modificação do ambiente pela agricultura e outras atividades humanas que alteram as condições naturais. Consignamos aqui penhorados agradecimentos ao Professor A. E. EMERSON, da Universidade de Chicago, pela identificação de nossos primeiros lotes de material, o que é indicado por suas iniciais entre os dados de cada amostra. Mencionamos, também, os estafilínidas termitófilos por nós colecionados em São Paulo e que foram iden-

(*) Recebido para publicação a 28 de setembro de 1958.

Este trabalho foi laureado com o Prêmio Mello-Leitão, pela Academia Brasileira de Ciências, em 1958.

tificados pelo DR. C. H. SEEVERS, do Museu de História Natural de Chicago e por FREI T. BORGMEIER. Por se tratar de espécies de grande interesse econômico, incluímos referências a presença de *Cryptotermes havilandi* e *Coptotermes havilandi* também no Distrito Federal, agradecendo ao Professor C. R. GONÇALVES e ao Dr. A. G. D'ARAUJO E SILVA pelo material e informações.

Não obstante o número considerável de espécies já descritas e estudos básicos de zoogeografia histórica (Cf. EMERSON, 1955), não estamos ainda em condições de elaborar um quadro da distribuição específica de nossos térmitas, nem mesmo no âmbito do Estado aqui considerado. Do ponto de vista termitológico encontram-se em tôda a Região Neotrópica dilatados territórios, e de condições ecológicas mui diversas, inteiramente por explorar; a área da dispersão das espécies ainda está frouxamente delimitada e os nichos por elas ocupados ainda não bem caracterizados. A identificação rotineira do material que nos chega às mãos vem constantemente revelando novos fatos biogeográficos. A continuidade e a expansão do trabalho que vimos realizando permitirão, sem dúvida, novas achegas a esta primeira contribuição, melhorando as possibilidades de interpretação dos dados acumulados.

Alguns fatos de ordem geral têm confirmação no estudo da fauna de cupins do Estado. Das cinco famílias em que se divide a ordem Isoptera, apenas uma acha-se inteiramente ausente, com formas vivas, do Novo Mundo: *Mastotermitidae*, monoespecífica e restrita à Austrália. COSTA LIMA refere-se (1944) a asas fósseis do Plioceno de Minas Gerais que, segundo EMERSON (1955: 491) "appear to represent a new primitive genus of this family". De *Kalotermitidae* faltam: *Calcaritermes*, *Kalotermes* e *Paraneotermes*, ausentes, aliás, do território brasileiro. De *Hodotermitidae*, apenas uma das quatro subfamílias, *Porotermitinae*, se faz representar na América, com a espécie rélicta *Porotermes quadricollis*, do Chile. Quatro das seis subfamílias de *Rhinotermitidae* acham-se ausentes de São Paulo, onde só aparecem representantes de *Coptotermitinae* e *Heterotermitinae*, faltando, desta última, *Reticulitermes*. Na grande família *Termitidae* encontram-se cinco subfamílias, duas das quais ausentes da área que nos ocupa: 1) *Serritermitinae*, monoespecífica, restrita ao Pará e Mato Grosso e 2) *Macrotermitinae*, das regiões Indomaláia, Etiópica e Malgache. Dos gêneros de 3) *Amitermitinae*, nota-se a ausência de *Amitermes*, *Conveitermes*, *Cylindrotermes*, *Gnathamitermes*, *Hoplotermes* (êstes dois últimos restrictos ao México) e *Synhamitermes*; de

4) *Nasutitermitinae* e faltam: *Angularitermes*, *Obtusitermes*, *Parvitermes*, *Rotunditermes*, *Tenuirostritermes*, e *Velocitermes*; de 5) *Termitinae*, faltam: *Cavitermes*, *Cornicapritermes*, *Crepititermes*, *Genuotermes*, *Planicapritermes* e *Spicotermes*.

Não se encontram em São Paulo gêneros endêmicos e somente três espécies (*Cornitermes villosus*, *Paracornitermes emersoni* e *Syntermes insidians*) mostram distribuição aparentemente confinada ao Estado. Tal situação zoogeográfica, como se apresenta no momento, pode ser explicada pelo fato de São Paulo participar estreitamente da ambiência de zonas adjacentes ao seu território, no âmbito do qual se observam condições edáficas, climáticas e fitológicas comuns a Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Paraná, estados em que também ocorrem elementos da fauna termitológica de São Paulo. É, todavia, possível e mesmo provável que a rebusca dos variados biótopos do Estado revele endemismos e peculiaridades faunísticas características.

Vale anotar que as espécies seguintes, são pela primeira vez constatadas no Brasil: *Cryptotermes brevis*, *Coptotermes havilandi*, *Rugitermes occidentalis*, ? *Anoplotermes howardi* e *Nasutitermes silvestrii*.

RESENHA HISTÓRICA

O conhecimento dos cupins neotrópicos evoluiu, no passado, com a morosidade que caracterizou a pesquisa de quase todos os grupos de insetos obscuros, sem atrativos para amadores e cujo colecionamento, conservação e estudo demandam técnicas mais acuradas. As espécies iam sendo descritas desarticuladamente e as poucas observações ecológicas registradas de maneira fragmentária, embora haja numerosas referências antigas aos estragos causados por certas espécies.

LINEU (1758) classificou três espécies de cupins neotrópicos: 1) *fatalis*, do Surinam, no gênero *Termes* que então criou entre os Insecta Aptera; 2) *testaceus* e 3) *marginalis*, da "América" (respectivamente *Coptotermes* e *Rhinotermes*), que incluiu no gênero *Heimerobius*, entre os Neuroptera. Todas essas espécies foram posteriormente encontradas no Brasil, mas foi PERTY (1930) quem pela primeira vez descreveu uma espécie originariamente brasileira, *Rhinotermes nasutus*. LATREILLE (1811-32), ao estudar insetos coletados por HUMBOLDT, descreve *Kalotermes marginipennis*, do México. Seguem-se as descrições de KOLLAR (1832, 1858) de *Cornitermes*

cumulans e *Anoplotermes fumosus*, ambas de São Paulo. BURMEISTER (1839) dá a conhecer duas espécies das Antilhas, *Neotermes castaneus* e *Nasutitermes lividus* e três do Brasil, pela segunda vez mencionadas na literatura, *Anoplotermes cingulatus*, *Syntermes dirus* e *S. molestus*. RAMBUR (1842) revela três novas espécies: 1) *Poro-termes quadricollis*, do Chile, de importância especial, pois trata-se de relicto de um grupo extinto "over most of its ancient range" (EMERSON, 1952: 218); 2) *Nasutitermes ripertii*, largamente disseminado nas Antilhas e 3) *Syntermes grandis*, da Caiena. Aparecem daí por diante as descrições esparsas de Motschulski (2 espécies), WALKER (2), HALDEMAN (1), SÖRENSEN (1), BLANCHARD (1), BATES (2), VON ROSEN (1) e, mais recentemente, JOHN (2) e GOETSCH (2 spp.).

A contribuição de HAGEN (1855-60) é especialmente valiosa pois, na sua "Monographie der Termiten", compendiou tudo o que até então sabia-se a respeito dos cupins, acrescentando suas próprias observações. Descreveu três gêneros e 14 espécies neotrópicas e compilou um completo repositório de conhecimentos históricos, bionômicos, faunísticos e sistemáticos. Esse trabalho é também o primeiro catálogo da ordem Isoptera e, dada a minúcia com que foi elaborado, erigiu-se em marco inicial do estudo metódico do grupo.

NATHAN BANKS criou um gênero e descreveu 18 espécies, na grande maioria da América Central e Antilhas e, em associação com SNYDER, deu a conhecer mais cinco espécies. S. F. LIGHT (1932-33, 1937) estabeleceu três gêneros e descreveu 17 espécies que, com duas exceções (1 dos E. U. e 1 da Costa Rica), pertencem à fauna mexicana. Menção especial faça-se de FRITZ MUELLER a quem se deve (1873), a par de estudos de ordem bionômica, o conhecimento do interessante gênero desprovido da casta dos "soldados", *Anoplotermes*, e de três espécies brasileiras. Em fins do século passado, WASMANN, ao lado de seus estudos das formigas, dos mirmecófilos e termitófilos, iniciou contribuições (1896-1902) para o estudo dos cupins. A ele devemos seis dos gêneros neotrópicos e quatro espécies. J. DESNEUX, em sua série de trabalhos, tanto sistemáticos como biológicos dos cupins de todo o mundo (1902-1956), descreveu seis espécies neotrópicas; catalogou todas as formas do grupo na bem conhecida enciclopédia entomológica "Genera Insectorum" (1904).

Em princípios do século atual, o mestre entomologista italiano FILIPPO SILVESTRI publicou seu notável estudo sobre os cupins da América Meridional (1903), que é também a primeira contribuição sistematizada para o conhecimento dos térmitas do Brasil. Nesse e outros estudos subseqüentes dá a conhecer o total de 1 gênero e 45 espécies neotrópicas. Enriqueceu seus trabalhos com valiosas obser-

vações bionômicas e prestou especial atenção aos termitófilos e outros organismos associados às colônias de cupins. Realizou SILVESTRI três viagens à América do Sul. A primeira, de agosto de 1898 a novembro de 1900, a muitos lugares da Argentina, Uruguai, Chile, Paraguai e Brasil. Na segunda, de fevereiro a outubro de 1935, visitou os mesmos países e mais o Peru. Na terceira, de janeiro a outubro de 1937, demorou-se em São Paulo, mas visitou também o Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, Bahia e Pernambuco. O copioso material por ele colhido nessas duas últimas viagens não foi, infelizmente, todo estudado.

A sistemática da ordem Isoptera teve suas bases modernas na extensa obra do entomologista sueco NILS HOLMGREN, cujos estudos anatômicos, bionômicos, zoogeográficos e o grande número de formas descritas, lhe permitiram estabelecer os princípios da filogenia da ordem. Foi membro da expedição de ERLAND NORDENSKIÖLD à América do Sul, onde, na Bolívia e Peru, colecionou valiosíssimo material. Seus notáveis "Termitenstudien" (1909-1913) constituem imenso repertório de fatos e são uma fonte de inspiração para o estudo dos cupins de todo o mundo. Descreveu um total de 19 gêneros e 65 espécie neotrópicas.

THOMAZ ELLIOT SNYDER iniciou em 1920 seus trabalhos sobre cupins e, embora aposentado, trabalha ativamente no Museu Nacional dos Estados Unidos. Deu a conhecer 3 gêneros novos, um deles em colaboração com EMERSON. Onde, porém, mais pesa sua contribuição para a sistemática é no grande número de formas neotrópicas que descreveu, num total de 94 espécies, sendo nesse sentido o autor que mais tem contribuído. Publicou em 1949 o catálogo dos cupins do mundo, obra de extraordinária valia para o estudo sistemático e histórico da ordem e dá-nos agora essa notável bibliografia analítica dos térmitas (1956), que é instrumento indispensável a quem se dedique a qualquer setor do estudo dos térmitas. SNYDER, por si e em colaboração com outrem, publicou também larga série de contribuições para o estudo do combate às espécies daninhas de cupins.

ALFRED EDWARD EMERSON, professor de Zoologia na Universidade de Chicago, E. U., teve seu primeiro trabalho publicado em 1924, a descrição de uma espécie das Ilhas de Juan Fernandez, iniciando a considerável série de contribuições que o fizeram talvez a maior autoridade em taxonomia, zoogeografia, ecologia e evolução de Isoptera. E' de 1925 sua importante tese sobre os cupins de Kartabo, Guiana Inglesa, onde trabalhara como assistente-pesquisa-

dor da Sociedade Zoológica de Nova Iorque. Estabelece nessa tese um gênero e descreve 53 espécies. Seu trabalho de 1928, sobre a fauna termitológica do Congo Belga, tem especial interesse para nós pelo capítulo sobre a distribuição geográfica das espécies de todo o mundo. A esse assunto volta mais tarde (1952, 1955) com duas contribuições em que discute a biogeografia dos térmitas em geral. Há poucos anos iniciou uma série de monografias de gêneros neotrópicos, que se salientam como notáveis revisões em moldes modernos. Por si, e em colaboração com outrem, já descreveu 13 gêneros e 87 espécies neotrópicas. Sua coleção, doada ao Museu Americano de História Natural, mas sob sua custódia, é a melhor do mundo, eis que entre outros valores, contem representantes de 92 por cento das 1.687 espécies vivas que se conhecem, incluindo as que tem inéditas. Realizou viagens de estudos à África e à Europa onde, recentemente, reviu precioso material original de muitos autores, o que lhe permitirá a solução de numerosas dúvidas nomenclaturais e de outros problemas da taxonomia dos térmitas.

Outras contribuições fundamentais para o estudo da ordem devem ainda ser mencionadas. Em 1949 aparece no tomo IX do grande "Traité de Zoologie", publicado sob a direção de PIERRE-PAUL GRASSÉ, o capítulo sobre Isoptera da autoria desse mesmo zoólogo que se vem notabilizando como eminente autoridade na biologia dos cupins. É uma alentada contribuição que se revela, talvez, o mais notável trabalho de conjunto sobre o grupo. GRIFFIN (1951) dá-nos essa excelente "Bibliography of the Isoptera", cobrindo o período de 1758 a 1949. MUZAFFER AHMAD obtém o seu grau de doutoramento em filosofia na Universidade de Chicago, sob a orientação de EMERSON, com uma tese de extraordinário valor, em que, servindo-se do estudo das mandíbulas dos imagos e operários, estabelece firme base para a filogenia dos gêneros dos térmitas.

No Brasil, afora as contribuições de FRITZ MUELLER já mencionadas e publicadas no estrangeiro, encontramos as de IHERING (1887), sobre a alternância de gerações dos cupins, e as de GUSTAVO D'UTRA (1905), O. CUNHA (1927, 1935-6), O. MONTE (1930, 1931) e J. PINTO DA FONSECA (1940, 1950), todas dedicadas a aspectos econômicos do problema dos cupins nocivos.

COSTA LIMA (1938, 1941, 1942) estuda espécies de Kalotermitidae e disserta sobre espécies que broqueiam plantas vivas (1941). Sua mais notável contribuição, porém, acha-se no tomo I de sua grande obra "Insetos do Brasil" (1939) em que, no capítulo sobre Isoptera, apresenta esplêndida sùmula do que se sabe sobre a biologia e classificação da ordem.

DADOS FISIOGRAFICOS

O Estado de São Paulo, com a superfície de 246.241 km², está situado dentro das seguintes coordenadas: 19° 45' — 25° 15' S e 44° 10' — 53° 10' W.G. Acha-se na subregião *Brasiliiana*, encontrando-se em seu território os limites de três províncias: a) *Cariribororo*, a noroeste; b) *Tupi*, limitada pela Serra do Mar e c) *Guarani*, a maior de tôdas, que compreende o restante do estado (Cf. MELLO-LEITÃO, 1947: 510, 535, 555).

Dados sobre clima, precipitação e temperatura podem ser vistos nos mapas de SETZER (1946). Em apêndice encontra-se uma lista das localidades mencionadas e sua posição geográfica.

Os elementos faunísticos termitológicos, que até agora se reuniram, são insuficientes para conclusões e generalizações no que tange a caracterização dessas províncias, pois não temos senão um levantamento imperfeito das faunas dos vários biomas que nelas se encontram: florestas tropicais higrófilas, formações savânicas, terras de cultura, pastagens, manguesais, etc.

LISTA DOS CUPINS DO ESTADO DE SÃO PAULO

KALOTERMITIDAE

1 — **Cryptotermes brevis* (WALKER, 1853)

Esta espécie, de larga distribuição geográfica, pois é cosmotropical, não havia ainda sido encontrada no Brasil. Na Região Neotrópica habita quase tôdas as Antilhas, muitos países da América Central e, na América do Sul, a Colômbia, Guiana Inglesa, Ilhas Galápagos, Peru e Chile. É espécie extremamente daninha, que ataca grande número de madeiras.

São Paulo: n.º 3373, B. L. RIBEIRO coll., VI.1951, colônia em moldura de quadro; — n.º 3850, O. BARONI coll., 18.V.1953, "em madeira de revestimento de paredes e em móveis"; — n.º 3851, J. F. PRADO coll., 4.I.1953 "em madeira trabalhada"; — n.º 4242 J. F. PRADO coll., VIII.1954, "em cabides de madeira"; — n.º 4251, J. F. PRADO coll., XI.1954, "em madeira de fôrro de casa"; — n.º 4325, F. DE MELLO leg., XI.1953; — n.º 4327, F. DE MELLO leg., "em teto de casa". *Limeira*: n.º 3842, F. TOLEDO CABRAL coll., 26.V.1953. *Piracicaba*: n.º 4249, J. F. PRADO coll., III.1954; — n.º 4250, J. F. PRADO coll., III.1954. *Campinas*: n.º 4326, F. DE MELLO leg., III.1952.

2 — *Cryptotermes havilandi* (SJÖSTEDT, 1900)

A pátria original de *C. havilandi* é, ao que tudo leva a crer, a costa leste da África, donde foi transportada em tempos remotos para Madagascar onde vive em ambiente natural e não somente em habitats modificados pelo homem. Está hoje espalhada em quase toda a África, encontra-se na Índia e em várias localidades da região Neotrópica (Antilhas, Guianas) inclusive no Brasil onde sua presença foi assinalada em Santos, SP. por F. DE MELLO, em 1952. Esta espécie foi recentemente estudada por L. I. MOSZCOWSKI (1955) cujo trabalho compendia todos os conhecimentos que sobre ela se têm.

C. havilandi tem sido encontrada em madeiramento de construção, provocando danos consideráveis e poderá vir a constituir em nosso país praga de grande importância econômica. Do Estado de São Paulo, temos material de Santos (n.º 4254, Seção de Vigilância Sanitária Vegetal do Instituto Biológico coll., 1954, “em madeira de construção”). Dada a importância econômica da espécie, vale assinalar que *Cryptotermes havilandi* foi também encontrado em Guaratiba, DF (n.º 4561, A. G. D'ARAUJO E SILVA coll., 12.VII.1953 [Coll. Divisão de Defesa Sanitária Vegetal, Ministério da Agricultura n.º 10.062] “em esteio”, que abrigava também uma colônia de *Coptotermes havilandi*.

Esta localização ainda periférica de *Cryptotermes havilandi* em nosso país, parece indicar ser recente sua introdução, já que a espécie não foi encontrada a poucos quilômetros de distância, em direção ao interior, em lugares onde outras espécies que vivem em madeira seca são freqüentes. Parece ainda restricta aos portos de entrada e a madeiras de construção, não lhe tendo ainda sido possível vencer as barreiras que impedem sua adaptação aos ambientes naturais.

3 — **Eucryptotermes wheeleri* SNYDER ET EMERSON, 1949

Conhecida somente da localidade original, Blumenau, SC, esta espécie foi encontrada a poucos quilômetros da cidade de Atibaia: n.º 3855, R. L. ARAUJO coll., 23.VIII.1953, em mourão de cêrca em que havia também uma colônia de *Rugitermes rugosus*; o material foi comparado com um cótipo assim rotulado: “*Calotermes Hageni*, coll. et det. F. MÜLLER, Blumenau, n.º 5426, Berlin Museum” e que se acha na Coll. Emerson; — n.º 3864, R. L. ARAUJO coll., 27.VII.1953, em zona seca, profunda, de árvore viva; o material foi com-

parado com topótipo, na Coll. Emerson, coletado por FRITZ MUELLER, n.º 5430 do Museu de Berlin.

4 — **Glyptotermes canellae* (FR. MUELLER, 1873)

A espécie, além das localidades originais (em Santa Catari-na), foi colecionada por SILVESTRI, na Argentina.

Santo Amaro: n.º 3223, R. L. ARAUJO coll., 17.IX.1950, em ga-lerias de um tóco sêco, rijo.

5 — **Rugitermes rugosus* (HAGEN, 1858)

Cupim de madeira sêca, até agora não verificado no Estado de São Paulo.

Santa Ernestina: n.º 3083, R. L. ARAUJO coll., 23.X.1947, colônia em tóco sêco de uma laranjeira. *São Paulo*: n. 3087, W. MALUF coll., 4.XI.1947, em madeira sêca; material comparado com autótipo coll. e det. em 4.IX.1871, por FRITZ MUELLER, em Itajaí, SC e redeterminado por HAGEN; — n.º 3111, W. MALUF coll., V.1948, em madeira sêca; material comparado com o autótipo mencionado acima; — n.º 3218, R. L. ARAUJO coll., 30.V.1950, em madeira sêca. *Atibaia*: n.º 3856, R. L. ARAUJO coll., 23.VII.1953, em mourão sêco onde se achava também uma colônia de *Eucryptotermes wheeleri*; n.º 3857, R. L. ARAUJO coll., 23.VII.1953, em mourão sêco.

RHINOTERMITIDAE

Coptotermittinae

6 — **Coptotermes havilandi* HOLMGREN, 1911

A descrição dessa espécie, economicamente muito importan-te, baseiou-se em material procedente do Ceilão. Sua presença foi registrada para Barbados, por R. W. E. TUCKER (1939) que declara não ter a espécie "previously been recorded from the New World". Informa ainda êsse autor que encontrara uma espécie de *Copto-termes*, provisoriamente determinada como *havilandi*, em uma par-tida de madeira da Guiana Inglesa e considera possível que a es-pécie já lá estivesse estabelecida. Foi nesse mesmo ano (1939) que EMERSON registrou a presença da espécie na Jamaica (sob o si-nônimo *C. javanicus* KEMNER). E' possível que o *Coptotermes* não identificado especificamente e mencionado por ADAMSON em 1938, seja *C. havilandi*, como o admite SNYDER (1949: 79). A espécie ocorre

no Sião, Málaga, Java e foi introduzido em Mauritius, em Barbados e na Jamaica. Registramos agora sua presença no Brasil, nas seguintes localidades:

Santos: n.º 981, R. L. ARAUJO coll., 13.IX.1934 [A. E. E. det. 7.I.1953], madeira de construção e móveis de um hotel; — n.º 3118, J. F. PRADO coll., 31.V.1948 [A. E. E. det.] “em madeira rija de assoalho”; — n.º 4255, Secção de Vigilância Sanitária Vegetal do Instituto Biológico coll., 1954. *Rio de Janeiro*, DF.: n.º 2731, T. BORGMEIER coll., 13.VIII.1923; — n.º 2955, ? coll., III.1927 [A. E. E. det.]; — n.º 4570, A. G. D'ARAUJO E SILVA coll., 24.VIII.1948 [Coll. da DDSV, M. Agric., n.º 8610], “... galeria em tronco morto de abacateiro”; — n.º 4571, C. R. GONÇALVES coll., 7.IV.1954 [DDSV n.º 10503], “atacando sementes de algodão armazenadas”; — n.º 4573, DIÓGENES CARDOSO coll., X.1954, “... sob casca solta de abacateiro” [DDSV n.º 10775]; — n.º 4568, C. H. REINIGER coll., 16. VII.1953, “atacando madeiramento de sucupira que reveste as paredes internas do edificio...” [DDSV 10080]. *Guaratiba*, DF.: n.º 4567, A. G. D'ARAUJO E SILVA coll., VI.1953, “... atacando madeira branca em casa velha de taipa” [DDSV 10060]; — n.º 4569, A. G. D'ARAUJO E SILVA coll., 29.III.1953 [DDSV 9943], “... penetraram na madeira de pinho de uma estante e roeram livros e revistas, causando grandes estragos”; — n.º 4572, A. G. D'ARAUJO E SILVA coll., 30.V.1953 [DDSV 10003], “... atacando livros, revistas e jornais”.

A espécie parece ter populações muito numerosas nos lugares acima indicados e todos situados na orla marítima ou bem próximos dela, o que indica introdução relativamente recente, embora já há cerca de um quarto de século a encontrássemos em Santos onde se achava sólida e abundantemente instalada num grande prédio. As observações de A. G. D'ARAUJO E SILVA (4570) e de DIÓGENES CARDOSO (4573), que encontraram o *Coptotermes havilandi* em galerias de tronco morto de abacateiro e sob a casca dessa mesma árvore, parecem indicar um princípio de invasão do meio natural, embora o abacateiro seja planta cultivada, pois todos os demais achados referem-se a madeiras de construção. Avento aqui a hipótese de referir-se COSTA LIMA (1939: 322) a esta espécie sob o nome de *C. vastator* LIGHT.

7 — **Coptotermes testaceus* (L., 1758)

Esta espécie, de larga distribuição na região Neotrópica, onde foi registrada nas Antilhas, América Central, nas Guianas, Venezue-

la, Chile, Bolívia, Argentina e Brasil (Amazonas, Pará, Mato Grosso e Goiás) é agora assinalada pela primeira vez em São Paulo.

Novo Horizonte: n.º 2653, R. L. ARAUJO coll., 24.XI.1944, em galerias de pau sêco, numa queimada; quando seguros com a pinça-os soldados expellem da glândula frontal uma gota de líquido leitoso, branco, que não é esguichada. Encontra-se a espécie também na cidade do Rio de Janeiro, DF (n.º 2732, T. BORGMEIER coll., 21.VIII.1925), “em madeiramento de casa”.

Heterotermittinae

8 — *Heterotermes longiceps* (SNYDER, 1924)

Conhecida de Mato Grosso, Minas Gerais e Paraguai.

Santa Ernestina: n.º 2854, R. L. ARAUJO coll., 23.III.1945 [AEE det.], sob casca de tóco sêco; — n.º 3081, R. L. ARAUJO coll., 23.X.1947, grande colônia, com inúmeros alados, em mourão de cerca.

9 — *Heterotermes tenuis* (HAGEN, 1858)

A distribuição geográfica dessa espécie cobre praticamente toda a região Neotropical. No Brasil já havia sido encontrada no Pará e em Mato Grosso.

Taquaritinga: n.º 2446, R. L. ARAUJO coll., 28.IX.1944, sob tronco semi-apodrecido, no solo; — n.º 2451, R. L. ARAUJO coll., 28.IX.1944. *Araraquara*: n.º 2514, M. C. LEITE coll., 10.X.1944. *Novo Horizonte*: n.º 2635, R. L. ARAUJO coll., 22.XI.1944, sob tronco de mamoeiro semi-apodrecido, em galerias superficiais no solo e na periferia do tronco. *Aimorés*: n.º 3051, D. BRAZ coll., VIII.1947, “sob colmo de milho jazente no solo”. *Pirassununga*: n.º 3065, D. BRAZ coll., 28.IX.1947, “sob tronco morto de coqueiro”; — n.º 3877, D. BRAZ coll., 28.IX.1947, “no ninho de outra espécie” [*Armitermes festivellus*]. *Araras*: n.º 4323, ? coll., 30.III.1953, “no telhado de uma casa”. *Sertãozinho*: n.º 3390, F. DE MELLO leg., 12.IX.1951, “em livros e jornais”; — n.º 3389, F. DE MELLO leg. *Santa Ernestina*: n.º 2853, R. L. ARAUJO coll., 22.III.1945, sob casca de tóco sêco; n.º 2967, R. L. ARAUJO coll., 10.VIII.1946, em galerias de tóco sêco; constroem passagens cobertas sobre troncos de *Eucalyptus* e tanto soldados como operários penetram a madeira viva daquela planta por orifícios redondos, diminutos; — n.º 2969, R. L. ARAUJO coll.,

10.VIII.1946, em largas galerias de tóco sêco, semi-apodrecido; — n.º 3079, R. L. ARAUJO coll., 23.X.1947, na zona ainda rija de um tronco apodrecido.

TERMITIDAE

A m i t e r m i t i n a e

10 — **Anoplotermes bequaerti* SNYDER ET EMERSON, 1949

Esta espécie do Paraguai e Argentina é, pela primeira vez constatada no Brasil.

Assis: n.º 2991, R. L. ARAUJO coll., 6.IX.1946, pequeno ninho de terra, friável, quase totalmente epígeo, de estrutura interna uniforme, isto é, sem zonas especiais diferenciadas, num pasto; numerosos alados prontos para revoada. *São Paulo*: n.º 3072, R. L. ARAUJO coll., 8.X.1947, ninho de terra, com alados quase em maturidade; — n.º 3257, R. L. ARAUJO coll., 30.V.1950 (Morumbi): neste ninho foram encontrados 49 estafilínidas (Col.) ainda não estudados; — n.º 3280, W. MALUF coll., 20.XI.1950 (Eldorado). *São Bernardo do Campo*: n.º 3286, W. MALUF coll., 20.XI.1950. *Pirituba*: n.º 3347, R. L. ARAUJO coll., 15.V.1951. *Bauru*: n.º 3464, K. P. SCHMIDT coll., 17.VII.1926 [A. E. E. det. et leg.].

11 — **Anoplotermes ?howardi* SNYDER, 1926

A única referência à distribuição desta espécie é a da descrição original: Rosário, Bolívia. Algumas amostras de *Anoplotermes* incluídas na coleção do Instituto Biológico foram identificadas por A. E. EMERSON como *howardi*; subseqüentemente, seguindo o estimado mestre, determinei da mesma maneira outras amostras. EMERSON, embora achasse concordância com a descrição original, faz-me, in litteris, a ressalva de que se deve comparar o material com o tipo para uma decisão definitiva dessa identificação.

Leme: n.º 2424, R. L. ARAUJO ET D. BRAZ coll., 14.IX.1944 [A. E. E. det.], em pastagem sêca, não longe do Rio Mogí-Guassú; ninho de terra, pouco compacta, sem zonas internas diferenciadas; alados e ninfas; — n.º 2432, R. L. ARAUJO ET D. BRAZ coll., 13.IX.1944 [A. E. E. det.], em eucaliptal, ninho maciço, quase completamente ôco, 1 m de altura por 3,20 de circunferência na base; foram colecionadas 2 rainhas, muitos alados e ninfas, além de operárias e

grande quantidade de ovos e formas muito jovens. *São Paulo*: n.º 2702, R. L. ARAUJO coll., 12.XII.1944 (Ibirapuéra) [A. E. E. det.], ninho de terra, quase inteiramente epígeo, com alados e abundantes formas jovens; — n.º 3094, R. L. ARAUJO coll., 27.I.1948 (Jabaquara), ninho de terra, no solo, parcialmente apoiado a um tronco de árvore, com numerosos alados; — n.º 3096, R. L. ARAUJO coll., 27.I.1948 (Jabaquara), ninho de terra pouco compacto, no solo. *São Miguel Paulista*: n.º 3264, R. L. ARAUJO coll., 31.X.1950, colônia instalada nos largos septos que separam galerias de um ninho de *Syntermes wheeleri* (3261).

12 — *Anoplotermes pacificus* FRITZ MUELLER, 1873

Constatada originalmente em Santa Catarina, *A. pacificus* foi mais tarde encontrada no Peru, na Bolívia, Rio de Janeiro e em São Paulo (Jabaquara). Sobre essa interessante espécie e seu ninho, consulta-se com proveito o trabalho de PETER KAISER (1953).

São Paulo: n.º 3201, J. VAZ PUPO NOGUEIRA coll., XI.1949, "ninho de terra no solo". *Paranapiacaba*: n.º 3836, R. L. ARAUJO coll., 13.V.1953; — n.º 4304, R. L. ARAUJO coll., 28.V.1953 (comparado com cótipo, autótipo, de Itajaí, SC., FR. MUELLER coll., et det., X.1872).

13 — *Anoplotermes tenebrosus* KOLLAR, 1858

Originalmente descrita de Ipanema, SP., esta espécie ocorre, aparentemente, também no Rio Grande do Sul.

Gênero *Speculitermes*

Das 4 espécies neotrópicas descritas neste gênero, uma ocorre no Peru e na Bolívia e outra no Paraguai, Argentina e Mato Grosso, sendo pois de se esperar a presença do gênero no Estado de São Paulo, a exemplo de casos paralelos. De fato, temos na coleção pelo menos duas espécies novas de *Speculitermes* encontradas nesta área.

N a s u t i t e r m i t i n a e

14 — *Constrictotermes cyphergaster* (SILVESTRI, 1901)

E' espécie de larga distribuição no Brasil e habita também a Bolívia e Paraguai; costuma ser muito abundante nas áreas em que

ocorre e já fôra mencionada para São Paulo, por SILVESTRI. E' de grande importância biológica pois, entre outros hóspedes, abriga em suas colônias pelo menos cinco espécies de estafilínidas termitófilos e outras espécies de térmitas que parecem inquilinos obrigatórios. Os ninhos, próprios dos lugares abertos, como campos e pastagens, são muito freqüentemente apoiados a esteios, árvores ou pedras. Nosso material de São Paulo provém das seguintes localidades:

Aimorés: n.º 3103, D. BRAZ coll., 30.I.1948, "ninho de terra encostado a um eucalipto, pouco aprofundado no solo". *Bauru*: n.º 3912, R. L. ARAUJO coll., 22.X.1953; no interior do ninho foram encontrados: a) uma espécie de *Termes* ainda não identificada (4307) e b) ninfas de um calotermitida com rudimentos alares.

15 — *Cornitermes bequaerti* EMERSON, 1952

E' cupim de campo aberto, cerrados, pastagens e aparece também em eucaliptais. Seus ninhos de terra, caracterizam-se pelos "chaminés", isto é, as protuberâncias ôcas que se notam na superfície e constituem as aberturas externas dos canais da exoécia que percorrem o ninho em várias direções sem ligação com a endoécia, ou seja a parte em que se aloja a colônia. Estrutura semelhante ocorre nos ninhos de *Protermes minutus* GRASSÉ, 1937, da Costa do Marfim, África, como se pode apreciar em GRASSÉ, 1949: 510, figs. 159, 160. Para a distribuição geográfica minuciosa desta e das demais espécies de *Cornitermes*, consulte-se a excelente monografia de EMERSON (1952). As novas localidades do Estado de São Paulo, são:

Jacarei: n.º 3313, R. L. ARAUJO coll., 27.II.1951, em pasto; — n.º 3316, R. L. ARAUJO coll., 27.II.1951, em pasto. *São José dos Campos*: n.º 3845, A. SANCHES coll., 27.V.1953, campo.

16 — *Cornitermes cumulans* (KOLLAR, 1832)

Talvez a espécie mais freqüente no sul do Brasil e ocorre também no Paraguai e na Argentina (Cf. EMERSON, 1952: 515-17). Sua variabilidade morfológica é considerável e um estudo minucioso poderá revelar mais de uma forma nessas enormes populações. Ocorrem no Estado de São Paulo os seguintes estafilínidas hóspedes de *C. cumulans*, todos colecionados por nós, mas não associados às colônias aqui mencionadas: *Macrotrichurus brasiliensis* SILVESTRI, 1946; *Termitohospes unicolor* (SILV., 1947) e *Termitozophilus laetus* SILV., 1901. As novas localidades do Estado de São Paulo, são:

Louveira: n.º 159, OLIVEIRA FILHO coll., IX.1926. *Santa Ernestina*: n.º 2970, R. L. ARAUJO coll., 10.VIII.1946, material coletado em numerosas galerias na terra solta que rodeava um tóco seco e no próprio interior deste, em excavações provavelmente feitas por outro inseto. *Cruzeiro*: n.º 3024, R. L. ARAUJO coll., 30.VI.1947. *Jambreiro*: n.º 3036, P. L. ALVES VIEIRA JR. coll., 3.VII.1947, "ninho de terra, em eucaliptal". *Taubaté*: n.º 3038, P. L. ALVES VIEIRA JR., coll., 16.VII.1947, "ninho em eucaliptal". *Caçapava*: n.º 3040, P. L. ALVES VIEIRA JR. coll., 15.VII.1947, "em eucaliptal". *Rio das Pedras*: n.º 3045, J. TUCCI coll., 22.VII.1947, "ninho no campo". *Rio Claro*: n.º 3046, J. TUCCI coll., 16.VI.1947, "ninho no campo". *Pirassununga*: n.º 3067, D. BRAZ coll., 28.IX.1947, "soldados colecionados em detritos orgânicos sobre o solo, em companhia de outra espécie" [*Syntermes molestus*]. *Jacaré*: 3310, R. L. ARAUJO coll., 27.II.1951. *Piracicaba*: n.º 3873, L. G. E. LORDELLO coll., IV.1953.

EMERSON (1952: 518) é de opinião que *Cornitermes similis* (HAGEN, 1858), de Minas Gerais, será possivelmente incluída na sinonímia de *C. cumulans*, pois os adultos de ambas as espécies são praticamente indistinguíveis. Examinamos soldados procedentes de Rio Claro, SP. (n.º 2725, T. BORGMEIER coll., 30.VIII.1929, T. E. SNYDER det.) que não se diferenciam dos de *cumulans*. Sòmente alados, "nach vier getrockneten Stücken..." (HAGEN, 1858: 169), foram descritos e seu estudo (EMERSON, l. c.) não foi suficiente para esclarecer a identidade definitiva.

17 — *Cornitermes villosus* EMERSON, 1952

Desta espécie conhece-se sòmente o material típico, procedente de Guarani, SP (J. VIEIRA PINHEIRO coll., II.1943) e do qual há um parátipo na coleção do Instituto Biológico (3517). Segundo sugeri-me o Professor EMERSON, é aconselhável um estudo de material mais abundante para se confirmar a diferenciação entre ela e *C. bequaerti*.

Gênero *Curvitermes*

Nêste gênero, atualmente com duas espécies conhecidas, de Mato Grosso e Bolívia, há espécies novas, do Estado de São Paulo, em vias de serem descritas.

Gênero *Diversitermes*

Nenhuma das espécies de *Diversitermes* foi registrada em São Paulo. As duas mais comumente encontradas em larga área desse Estado, e também em Minas Gerais, são novas e aguardam publicação em futuro próximo. Temos ainda uma terceira espécie nova colecionada até agora somente em Santos, SP.

Gênero *Labiotermes*

Outro gênero sem representantes descritos no Estado de São Paulo, mas de onde há espécie inédita em nossa coleção.

Gênero *Microcerotermes*

Aqui agrupa-se meia dúzia de espécies descritas, nenhuma das quais no Estado de São Paulo. E' de se esperar que as espécies de larga distribuição, por exemplo, de Mato Grosso, sejam aqui encontradas. O gênero, porém, pode ser incluído na lista faunística desta área, pois temos na coleção duas novas espécies, uma das quais, muito freqüente no litoral do Estado, chega até ao Espírito Santo.

18 — **Armitermes euamignathus* SILVESTRI, 1901

Espécie bastante abundante nos lugares em que ocorre e até agora não constatada em São Paulo, onde encontramos-la nas seguintes localidades:

São Paulo: n.º 2314, R. L. ARAUJO coll., 9.VIII.1944 [A. E. E. det.], ninho pequeno, de terra, quase totalmente hipógeo, em campo; 2 rainhas pouco afastadas uma da outra, em galerias da base do ninho; poucas formas aladas, em parte ainda não maduras; — n.º 2321, R. L. ARAUJO coll., 10.VIII.1944 [A. E. E. det.], pequeno ninho em campo, pouco implantado no terreno, com 7 reis e 7 rainhas; — n.º 2904, R. L. ARAUJO coll., 25.IX.1945 [A. E. E. det.], ninho de terra, no campo, com numerosos alados, 21 rainhas e 6 reis, — n.º 3056, R. L. ARAUJO coll., 2.X.1947, ninho de terra em eucaliptal, alados quase totalmente amadurecidos, numerosas rainhas de substituição; — n.º 3120, R. L. ARAUJO coll., 8.IX.1948, ninho de terra, no campo, apenas parcialmente examinado, 61 rainhas de substituição com ovários amadurecidos e 19 outras com êsses órgãos ainda em desenvolvimento; — n.º 2905, R. L. ARAUJO coll., 25.IX.1945 [A. E. E. det.],

ninho em forma de coluna, de 14 cm de altura, com 14 cm de largura ao nível do solo, com base hipógea alargada e pouco implantada no solo; coloração exterior cinzenta, quase negra no interior; de consistência homogênea, quebradiço, com numerosas galerias irregulares, tortuosas, que em alguns casos chegavam a 1 cm de diâmetro; poucas formas jovens, ausência de alados. *Leme*: n.º 2425, R. L. ARAUJO coll., 12.IX.1944 [A. E. E. det.], ninho em pastagem, a parte epígea de 47 cm e a hipógea equivalente; ao nível do solo, no interior da parede externa do ninho uma pequena colônia de *Subulitermes* sp.; — n.º 2434, R. L. ARAUJO coll., 13.IX.1944 [A. E. E. det.], ninho de terra, de 1 m de comprimento, 0,50 de largura e 0,20 de espessura, encostado ao barranco de um valo; sem formas aladas; — n.º 2440, R. L. ARAUJO coll., 12.IX.1944, pequeno ninho de terra, em pastagem, a população concentrada na parte inferior, sem formas aladas. *Taquaritinga*: n.º 2447, R. L. ARAUJO coll., 28.IX.1944 [A. E. E. det.], cupins a invadir velho mourão de cêrca; — n.º 2448, R. L. ARAUJO coll., 28.IX.1944 [A. E. E. det.], ninho com alados. *Novo Horizonte*: n.º 2640, R. L. ARAUJO coll., 22.XI.1944 [A. E. E. det.], ninho de terra apoiado a um tronco de árvore e insinuado sob êle e em suas fendas; — n.º 2643, R. L. ARAUJO coll., 22.XI.1944, ninho no solo, sob tronco caído, com galerias que o penetravam; cerrado. *Tatuí*: n.º 2798, R. L. ARAUJO coll., 5.II.1945 [A. E. E. det.], ninho de terra, implantado até sua metade no solo e, em contraste todos os demais ninhos dessa espécie observados, tinha um núcleo central diferenciado, sendo possível que a colônia se tenha instalado em um velho ninho abandonado de *Cornitermes*; não continha alados; vários soldados de uma nova espécie de *Dentispicoterme*s (n.º 2799) achavam-se disseminados entre a população do *Armiterme*s; — n.º 2804, R. L. ARAUJO coll., 6.II.1945 [A. E. E. det.], ninho de terra, de estrutura homogênea, a circundar a base de um mourão de porteira, população numerosa porém sem alados; conseguimos coletar 7 reis e 7 rainhas, sendo possível que houvesse maior número; abriam-se na superfície do ninho pequenos tubos em comunicação com o interior, isto é, com a endoécia. *Jarinu*: n.º 2832, V. AUTUORI coll., 23.II.1945 [A. E. E. det.]; n.º 2833, V. AUTUORI coll., 24.II.1945 [A. E. E. det.]. *Santa Ernestina*: n.º 2851, R. L. ARAUJO coll., 22.III.1945, ninho de terra, em eucaliptal, com pequenos tubos eriçando-lhe a parte apical; — n.º 2972, R. L. ARAUJO coll., 10.VIII.1946 [A. E. E. det.], ninho de terra com galerias muito irregulares, encostado a um mourão de cêrca, em pastagem; — n.º 2976, R. L. ARAUJO coll., 11.VIII.1946 [A. E. E. det.], em cerrado, alados presentes; — n.º 3077, R. L. ARAUJO coll., 22.X.1947, ninho no cerrado, alados ausen-

tes. *Atibaia*: n.º 2930, R. L. ARAUJO coll., 19.III.1946 [A. E. E. det.], ninho de terra de consistência branda, em campo, sem alados; — n.º 2932, R. L. ARAUJO coll., 19.III.1946 [A. E. E. det.], ninho de terra, de largas galerias, no campo, sem alados; — n.º 2933, R. L. ARAUJO coll., 19.III.1946, ninho de terra, no campo, estrutura interna homogênea, galerias estreitas, 1 só rainha; — n.º 3867, R. L. ARAUJO coll., 27.VII.1953. *Aimorés*: n.º 3055, D. BRAZ coll., 6.IX. 1947, “ninho de terra, no campo”. *São Vicente*: n.º 3191, R. L. ARAUJO coll., 22.VII.1949.

19 — *Armitermes festivellus* SILVESTRI, 1901

Conhecida da Bolívia e do Mato Grosso, essa espécie foi referida para São Paulo, em 1946, por O. PARK quando descreveu um pse-láfida (*Hamatocellus araujoi*) hóspede do ninho. É esse o primeiro coleóptero dessa família que se encontra no Brasil associado a uma colônia de cupins.

São Paulo: n.º 2377, R. L. ARAUJO coll., 30.VIII.1944 [A. E. E. det.], ninho de terra, no solo, campo; em mistura com a população do *Armitermes*, uma nova espécie de *Curvitermes* (3881); — n.º 2443, R. L. ARAUJO coll., 8.VIII.1944; — n.º 2552, R. L. ARAUJO coll., 26.X. 1944 [A. E. E. det.], ninho de terra, de construção homogênea, com numerosos alados; no ninho encontravam-se duas espécies de formigas em preparação para o vôo nupcial; associava-se ainda à colônia imagos de *Anoplotermes pacificus*; — n.º 2555, R. L. ARAUJO et M. CARVALHO LEITE coll., 26.X.1944 [A. E. E. det.], ninho de terra, de construção uniforme, no solo, campo; nesta colônia foi encontrado o Pselaphidae acima referido e também operários de *Anoplotermes* sp. (2556); — n.º 4338, R. L. ARAUJO coll., 30.VIII.1944 [A. E. E. det.], ninho de terra, pouco implantado no solo, com o *Armitermes* e uma nova espécie de *Curvitermes* (2376) idêntica à que foi encontrada com a colônia de *A. festivellus* (2377) registrada acima. *Novo Horizonte*: n.º 2645, R. L. ARAUJO coll., 22.XI.1944 [A. E. E. det.], em galerias superficiais em um pau seco, no solo; cerrado. *Santa Rosa*: n.º 3047, E. F. PAIVA coll., 6.VIII.1947, “ninho de terra, terreno de cultura”; — n.º 3048, E. F. PAIVA coll., 6.VIII.1947, “ninho de terra, terreno de cultura”. *Pirassununga*: n.º 3066, D. BRAZ coll., 28.IX. 1947, “cupim de terra, no solo; em mistura com a população foram encontrados soldados de outra espécie” [*Spinitermes brevicornutus* (3875)]. *São José dos Campos*: n.º 3844, R. L. ARAUJO coll., 26.V. 1953, ninho de terra, em campo; foi colhido no mesmo ninho um

soldado de *Orthognathotermes*. *Jacareí*: n.º 4318, R. L. ARAUJO coll., 27.II.1951, ninho de terra no solo, campo; achavam-se na mesma colônia um *Labiotermes* (4319), um *Spinitermes* (4320) e uma nova espécie de *Diversitermes* (3314).

20 — *Armitermes holmgreni* SNYDER, 1926

E' com dúvida que consignamos a espécie nesta lista. Foi descrita da Bolívia e da Guiana Inglesa quase que simultaneamente. Ocorre também em Trinidad e sob o nome manuscrito "*Armitermes heyeri* WASMANN" foi registrada para São Paulo por WHEELER, em 1936, sem especificação de localidade.

Gênero *Nasutitermes*

Este gênero conta atualmente com 70 espécies e uma subespécie neotrópicas descritas e várias outras inéditas. Somente 4 achavam-se citadas para o Estado de São Paulo; acrescentamos agora mais 6 e podemos prever que o número de *Nasutitermes* nessa área será consideravelmente aumentado quando todo o material das coleções fôr estudado e quando mais intenso colecionamento puder ser levado a efeito.

21 — **Nasutitermes aquilinus* (HOLMGREN, 1910)

Do Paraguai e de Santa Catarina; a espécie parece ter larga distribuição, eis que já a encontramos até no sul do Estado de Minas Gerais.

São Vicente: n.º 2903, R. L. ARAUJO coll., 21.IX.1945 (Ilha Porchat) [A. E. E. det.], grande ninho arborícola, aparentemente abandonado, de periferia duríssima, caída ao solo, em picada da mata; — n.º 2889, R. L. ARAUJO coll., 18.IX.1945 (Ilha Porchat) [A. E. E. det.], população numerosíssima sob a casca e em galerias de madeira de um pau podre, caído ao solo, na mata. *Jarinu*: n.º 2837, V. AUTUORI coll., 1.III.1945 [A. E. E. det.]; — n.º 2838, V. AUTUORI coll., 28.II.1945 [A. E. E. det.], "ninho sobre mourão de cerca, com muitas rainhas, campo"; — n.º 2843, V. AUTUORI coll., 4.III.1945 [A. E. E. det.] "ninho sobre esteio de casa". *Leme*: n.º 2875, R. L. ARAUJO coll., 16.V.1945 [A. E. E. det.], ninho arborícola, em árvore do campo, população escassa, invadido por formigas; — n.º 2876, R. L. ARAUJO et D. BRAZ coll., 16.V.1945, ninho insinuado no interior de

tronco ainda de pé, apenas aflorando-lhe o tôpo. *Jacareí*: n.º 3315, R. L. ARAUJO coll., 27.II.1951.

22 — **Nasutitermes bivalens* (HOLMGREN, 1910)

Estava registrada somente para Mato Grosso. A confirmação da identidade de algumas amostras e a determinação daquelas ainda não estudadas poderão revelar uma distribuição geográfica surpreendentemente vasta desta espécie na subregião Brasileira. Hóspede: *Termitogaster nigricollis* (SILV., 1901), Col. Staphilinidae.

São Paulo: n.º 3287, R. L. ARAUJO coll., 20.II.1951 (Jabaquara) [A. E. E. det.]; no ninho desta colônia havia numerosos hóspedes, muitos ainda não identificados; — n.º 3392, W. MALUF et J. F. PRADO coll., 25.IX.1951 (Pinheiros); — n.º 3348, J. F. PRADO coll., 22.V.1951 (Vila Formosa). *São Bernardo do Campo*: n.º 3283, W. MALUF coll., 20.XI.1950; — n.º 3288, W. MALUF coll., 20.XI.1950. *Santo Amaro*: n.º 3233, R. L. ARAUJO coll., 10.X.1950 (Interlagos); — n.º 3326, J. F. PRADO coll., 10.IV.1951 (Interlagos); — n.º 3327, J. F. PRADO coll., 10.IV.1951 (Interlagos); — n.º 3331, J. F. PRADO coll., 10.IV.1951 (Marsilack); — n.º 3339, J. F. PRADO coll., 17.IV.1951 (Interlagos). *São Miguel Paulista*: n.º 2453, M. C. LEITE coll., 2.X.1944 [A. E. E. det.]. *Birigui*: n.º 2348, material enviado por um fazendeiro, I.1934, "atacando cafeeiro" [A. E. E. det.]. *Novo Horizonte*: n.º 2638, R. L. ARAUJO coll., 22.XI.1944 [A. E. E. det.], em galho seco, caído ao solo, no campo; — n.º 3639, R. L. ARAUJO coll., 22.XI.1944 [A. E. E. det.], ninho arborícola, a cerca de 3 m de altura, em árvore do campo; ao romper-se o ninho, grande número de soldados atirou-se para fora, forrando a área exposta; eram tantos e em tal tumulto que se enredavam em verdadeiros "cachos" com os jatos solidificados da secreção da glândula frontal cegamente esguichada em tôdas as direções. *Atibaia*: n.º 2935, R. L. ARAUJO coll., 19.III.1946; ninho hemisférico, no solo, campo; revestimento externo ruguloso, delgado, em seguida uma zona estreita de galerias tortuosas e ao centro um núcleo de material mais rijo, com galerias largas. *Jacareí*: n.º 2953, ? coll., III.1927.

23 — **Nasutitermes coripoensis* (HOLMGREN, 1910)

Colecionada até agora somente na localidade típica, em Mato Grosso, esta espécie revelou-se bastante abundante no Estado de São Paulo. Hóspede: *Abroteles badia* SEEVERS, 1957 (Col., Staphylinidae).

Jarinu: n.º 2836, V. AUTUORI coll., 27.II.1945 [A. E. E. det.].
Boraceia: n.º 2939, R. L. ARAUJO coll., 12.IV.1946 [A. E. E. det.], grande grupo de soldados e operários, com algumas formas jovens, todos ativos e em excelentes condições, no interior de um tronco morto, ao lado de estrada, em zona sem vegetação; o tronco estava quase encharcado e algumas das galerias onde se achavam cupins continham muita água; na parte ainda intacta do tronco, uma colônia de *Rugitermes* (2938). *Atibaia*: n.º 2931, R. L. ARAUJO coll., 19.III.1946, [A. E. E. det.], campo, pequeno ninho através o qual crescia capim, população muito numerosa. *São Paulo*: n.º 3103, R. L. ARAUJO coll., 27.I.1948, pequeno ninho no solo, apenas uma quarta parte aflorava à superfície; — n.º 3376, R. L. ARAUJO coll., 3.VIII.51 (Congonhas); — n.º 3386, W. MALUF coll., 19.IX.1951 (Congonhas); — n.º 3380, J. F. PRADO coll., 31.VII.1951 (Vila Primavera).

24 — *Nasutitermes ehrhardti* (HOLMGREN, 1910)

Espécie do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, encontrada agora nas seguintes localidades do Estado de São Paulo:

São Manoel: n.º 2718, J. F. PRADO coll., [A. E. E. det.], “galerias em madeira seca”. *São Vicente*: n.º 2896, R. L. ARAUJO coll., 19.IX.1945, sob casca e em galerias de pau podre e muito úmido; — n.º 2899, R. L. ARAUJO coll., em galerias de pau seco, na mata; — n.º 2901, R. L. ARAUJO coll., 20.IX.1945 [A. E. E. det.], em galerias de pau podre, na mata; — n.º 3303, R. L. ARAUJO coll., 10.II.1951. *Iepê*: n.º 2988, R. L. ARAUJO coll., 5.IX.1946 [A. E. E. det.], em tóco podre, na mata.

25 — *Nasutitermes fulviceps* (SILVESTRI, 1901)

Espécie que ocorre de São Paulo (sem especificação de localidade) ao Rio Grande do Sul, Argentina, Uruguai e Paraguai.

26 — *Nasutitermes globiceps* (HOLMGREN, 1910)

Do Paraguai, Mato Grosso e São Paulo. Sua presença neste Estado foi revelada por SEEVERS (1946) que estudou estafilida hóspede, procedente de Mogi-Mirim.

Taquaritinga: n.º 2449, R. L. ARAUJO coll., 28.IX.1944 [A. E. E. det.], ninho arborícola em mourão de cerca de pastagens; — n.º

2450, R. L. ARAUJO coll., 28.IX.1944 [A. E. E. det.], ninho de tipo arborícola em mourão de cêrca. *Novo Horizonte*: n.º 2636, R. L. ARAUJO coll., 22.XI.1944 [A. E. E. det.], material colhido em pau sêco, num pomar. *Santa Ernestina*: n.º 2855, R. L. ARAUJO coll., 23. III.1945 [A. E. E. det.], ninho arborícola na extremidade de um tôco ainda preso a uma grande mangueira, num pomar; o ninho insinuava-se em todos os interstícios do tôco e havia galerias cobertas superficiais que se prolongavam para o alto da árvore; grande quantidade de ovos e formas jovens; — n.º 2973, R. L. ARAUJO coll., 10. VIII.1946 [A. E. E. det.], galerias superficiais cobertas num mourão de cêrca e o ninho insinuado nas fendas da madeira; — n.º 3078, R. L. ARAUJO coll., 23.X.1947, cupim arborícola entre galhos de um eucalipto, com galerias cobertas descendentes; — n.º 3080, R. L. ARAUJO coll., 23.X.1947, cupim arborícola com galerias superficiais descendentes; pastagem; — n.º 3082, R. L. ARAUJO coll., 23. X.1947, pequeno cupim arborícola em forquilha de velha mangueira, num pomar. *Dobrada*: n.º 2980, R. L. ARAUJO coll., 12. VIII.1946 (Fazenda Santa Elisa) [A. E. E. det.], em grande galho caído e inteiramente rendado de galerias; população numerosa; picada em mata, perto do cerrado. *Iepê*: n.º 2982, R. L. ARAUJO coll., 4. IX.1946 [A. E. E. det.], em galerias de um tôco sêco, caído no pasto e em túneis na terra; — n.º 2985, R. L. ARAUJO coll., 4. IX.1946 [A. E. E. det.], ninho arborícola, em derrubada, galerias cobertas superficiais dirigidas para o solo; — n.º 2987, R. L. ARAUJO coll., 4. IX.1946 [A. E. E. det.], ninho arborícola em tronco morto ainda de pé, numa derrubada; aparentemente o ninho resistira à queima sofrida pela árvore. *Assis*: n.º 2990, R. L. ARAUJO coll., 6. IX.1946, ninho arborícola, com galerias descendentes sôbre o tronco da árvore que se achava em terreno de cultura à margem da estrada; dentro do ninho e aparentemente em harmonia com os donos da casa, uma colônia de *Scaura latitarsis* (FRIESE, 1900) (Hym., Apidae, Meliponinae, J. Moure det.). *Icem*: n.º 3200, A. PORTUGAL SANTOS coll., 2. XI.1949 (perto da Cachoeira do Marimbondó). *Matão*: n.º 3214, material enviado ao Instituto Biológico em V.1950 com a informação de que os cupins foram encontrados “em armazem com sacaria”.

27 — *Nasutitermes itapocuensis* (HOLMGREN, 1910)

O material para a descrição original proveio de Santa Catarina (Blumenau e Jaraguá) e de São Paulo (sem menção de localidade). Hóspede: *Xenogaster inquilina* BORGMEIER, 1950 (Col., Staphylinidae).

Leme: n.º 2439, R. L. ARAUJO coll., 14.IX.1944 [A. E. E. det.].
Santo Amaro: n.º 3329, J. F. PRADO coll., 10.IV.1951; — n.º 3330, J. F. PRADO coll., 10.IV.1951; — n.º 3332, J. F. PRADO coll., 10.IV.1951.

28 — *Nasutitermes jaraguae* (HOLMGREN, 1910)

Até agora encontrada sòmente em Santa Catarina e Santos, SP. Confirmamos esta indicação de HOLMGREN, pois coletamos duas amostras da espécie na mesma área.

São Vicente: n.º 2884, R. L. ARAUJO coll., 13.IX.1945 (Ilha Porchat), operários e soldados em galeria superficial numa árvore; galeria com 0,5 cm de diâmetro, ligando o solo ao alto da árvore, onde não se distinguia ninho. *Guarujá*: n.º 3108, J. F. PRADO coll., 10.IV.1948, "ninho arborícola em tronco de coqueiro morto, a pouca altura e ligado à parte hipógea por galeria superficial coberta".

29 — *Nasutitermes proximus* (SILVESTRI, 1901)

Registrada para o Uruguai, Santa Catarina e São Paulo (neste Estado sem indicação de localidade). Hóspedes: *Abroteles compacticornis* BORGM., 1950; *Termitophya araujoi* BORGM., 1950 e *Xenogaster inquilina* BORGM., 1950 (Col., Staphylinidae, T. BORMG. det.).

Leme: n.º 2431, R. L. ARAUJO et D. BRAZ coll., 13.IX.1944 [A. E. E. det.]. *São Vicente*: n.º 2894, R. L. ARAUJO coll., 19.IX.1945 (Ilha Porchat) [A. E. E. det.], em galerias de tóco na maior parte apodrecido, na mata; — n.º 2900, R. L. ARAUJO coll., 20.IX.1945 [A. E. E. det.], sob casca e em galerias de tronco sêco ainda em pé, na mata. *São Paulo*: n.º 3215, D. BRAZ coll., I.1950; — n.º 3219, J. F. PRADO coll., 22.VIII.1950, "ninho arborícola, na parede de porão de uma residência".

30 — **Nasutitermes silvestrii* (HOLMGREN, 1910)

Espécie da Argentina, e Paraguai, agora encontrada em São Paulo.

São Paulo: n.º 3263, R. L. ARAUJO coll., 2.XI.1950, ninho de terra, no solo, campo; — n.º 3368, R. L. ARAUJO coll., 26.VI.1951 (Congonhas); — n.º 3369, R. L. ARAUJO coll., 26.VI.1951 (Congonhas).

31 — *Paracornitermes emersoni* ARAUJO, 1954

É a única das quatro espécies descritas de *Paracornitermes* que se encontra em São Paulo, onde a colecionamos somente na localidade típica: Ipiranga e Sacoman, nos arredores da Capital. Tem como hóspede *Autuoria elegantulum* SILVESTRI, 1946 (Col., Staphylinidae). Com toda a probabilidade SEEVERS (1957: 68) está certo ao considerar o nome manuscrito '*Cornitermes "autuorii"* SILVESTRI' idêntico a *Paracornitermes emersoni*, eis que aquele termitófilo ocorre em colônias de ambas e foi colecionado em locais pouco afastados um do outro, Ipiranga e Jabaquara, bairros da periferia de São Paulo.

32 — *Procornitermes araujo* EMERSON, 1952

Espécie baseada em material do Estado de São Paulo, Goiás e Minas. Hóspede: *Scarabaeinus termitophilus* SILVESTRI, 1940 (Col., Scaraboidea, Aphodiidae).

Há na literatura um *nomen nudum*, "*Cornitermes persimilis* SILV." (Cf. EMERSON, 1952: 537) a designar espécie de identidade até agora ignorada. Podemos solucionar o problema, pois o material de nossa coleção, sob o número 4252 [rótulo: "*Cornitermes persimilis* SILV., Rio de los Coros. 28.V.1937", na caligrafia inconfundível de SILVESTRI] coincide perfeitamente com *Procornitermes araujo*. Resta-nos ainda identificar a localidade *Rio de los Coros* (sic), expressão grafada no pitoresco português do grande mestre, e que ainda não conseguimos localizar; deve ser no Estado de São Paulo, pois assim o afirma SILVESTRI que, naquele ano (1937) realizou viagens pelo interior do Estado a serviço do Instituto Biológico.

As localidades mencionadas na descrição original (EMERSON, 1952: 490-3), acrescentamos agora:

Caçapava: n.º 3043, P. L. ALVES VIEIRA JR. coll., 15.VII.1947, "ninho de terra em terreno de cultura". *Jambeiro*: n.º 3044, P. L. ALVES VIEIRA JR. coll., 3.VII.1947, "ninho de terra em terreno de cultura". *Jacareí*: n.º 3311, R. L. ARAUJO coll., 27.II.1951; — n.º 3317, R. L. ARAUJO coll., 27.II.1951.

33 — *Procornitermes lespesi* (MUELLER, 1871)

Esta espécie distingue-se pela nidificação peculiar, com ninhos policálicos, hipógeos, já descritos por FRITZ MUELLER (Cf. EMERSON, 1952: 488-9, ninho; 501, geogr.; — DESNEUX, 1952: 13-14, 73, 98; est.

L, ninho). Aproveito a oportunidade para retificar o nome empregado por DESNEUX, em seu magnífico trabalho (l. c., p. 98) ao designar o construtor do ninho representado em sua estampa L: trata-se de *P. lespesii* e não *P. araujoii*. O erro foi devido a uma confusão de minha parte.

A espécie já havia sido registrada para São Paulo, Capital, por EMERSON (l. c., p. 501) que determinou nosso material n.º 2551.

34 — *Procornitermes triacifer* (SILVESTRI, 1901)

A distribuição mencionada por EMERSON (1952: 494-5) acrescenta-se, para o Estado de São Paulo:

Palestina: n.º 577, A. O. MARTINS coll., VIII, 1930, "em colmo de cana de assucar". *Guarani*: n.º 2910, R. L. ARAUJO coll., 4.XII.1945. *Ribeirão Preto*: n.º 4613, C. R. GONÇALVES coll., 23.XI.1943, "em galerias subterrâneas que levavam até cestinhas com mudas de cafeeiro, cujas raízes prejudicavam".

35 — **Rhynchotermes nasutissimus* (SILVESTRI, 1901)

O gênero contém duas espécies, *perarmatus* da América Central e *nasutissimus* da Bolívia, Paraguai e Mato Grosso, que agora registramos para as seguintes localidades do Estado de São Paulo:

Novo Horizonte: n.º 2646, R. L. ARAUJO coll., 23.XI.1944 [A. E. E. det.], ninho de terra, com base hipógea, em terreno de cultura; — n.º 2651, R. L. ARAUJO coll., 24.XI.1944 [A. E. E. det.], sob tronco queimado, terreno de cultura. *Campinas*: n.º 2713, R. L. ARAUJO coll., 17.I.1945 (Fazenda Mato Dentro) [A. E. E. det.], colônia instalada na parede periférica, até abaixo da superfície do solo, de um cupinzeiro abandonado (provavelmente de *Cornitermes* sp.), com muitos alados; no mesmo ninho, uma espécie de *Speculitermes*; — n.º 2717, R. L. ARAUJO coll., 18.I.1945 (Fazenda Mato Dentro) [A. E. E. det.]. *Aimorés*: n.º 3050, D. BRAZ coll., VII.1947, "material colhido em pedaços de bulbo de bananeira sobre o solo; — n.º 3052, D. BRAZ coll., VII.1947, "cupins atraídos por pedaços de bulbos de bananeira, sobre o solo".

Gênero *Syntermes*

Esse gênero foi revisto por EMERSON (1945) que registra toda a distribuição geográfica até então conhecida. Seus recentes estudos de material típico, ainda não publicados, poderão mostrar alte-

rações na nomenclatura específica. Seguimos aqui a nomenclatura empregada naquela monografia (q. v.). As quatro espécies registradas para o Estado de São Paulo acrescentamos agora mais duas.

36 — *Syntermes dirus* (BURMEISTER, 1839)

EMERSON cita (l. c., p. 462), entre outras localidades, “Corcovado”, Rio, que declara não ter podido situar geograficamente. Trata-se da montanha junto à cidade do Rio de Janeiro donde, aliás, provém material estudado pelo próprio BURMEISTER. O mesmo autor cita “Mang”, julgando ser localidade, “possibly”, do Brasil Central. O material dessa procedência, conservado no Kaiser Wilhelm Institut, Berlin-Dahlen, foi colhido em 3.XI.1913 por R. FISCHER. Podemos esclarecer tratar-se de *Manguinhos*, subúrbio do Rio de Janeiro, onde se localiza o Instituto Oswaldo Cruz no qual trabalhava, então, o conhecido desenhista e entomólogo CARLOS RUDOLPH FISCHER, que enviou material entomológico daquela procedência à instituição alemã acima mencionada. Igualmente, a procedência “*Tijucca*” (sic) registrada por DESNEUX e situada por EMERSON (l. c.) “probably” em Santa Catarina, refere-se a um bem conhecido bairro da cidade do Rio de Janeiro. No Estado de São Paulo, anotamos a presença da espécie em:

Rincão: n.º 2722, alguns alados enviados por um fazendeiro, 26.I.1945 [A. E. E. det.].

37 — *Syntermes insidians* SILVESTRI, 1945

O material que serviu para a descrição original desta espécie proveio de Pitangueiras, SP. FONSECA (1949) e EMERSON (1952: 488) aduzem Guarani, no mesmo Estado. Possuimos uma amostra (4330) sem outras indicações senão “*Syntermes insidians* SILV.; SILV. det.” e que se achava, de longa data, na coleção geral de insetos do Instituto Biológico. E’ de crêr-se pertencer êsse material ao lote original estudado por SILVESTRI que se achava naquêle instituto na ocasião em que colecionou o seu material.

38 — *Syntermes molestus* (BURMEISTER, 1839)

Esta espécie, no estado atual dos conhecimentos, mostra uma larga distribuição geográfica, como se pode ver pelos seguintes pontos extremos em que a literatura a registra: Território do Rio Branco, Paraíba, Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso, Bolívia, Co-

lômbia e Venezuela. EMERSON (1945: 468-470), de cuja opinião participamos, registra a distribuição, comenta a variabilidade das populações das diferentes áreas e sugere que futuros estudos poderão revelar mais de uma espécie nesse complexo. Localidades a serem acrescentadas à distribuição de *Syntermes molestus*, no Estado de São Paulo:

Taubaté: n.º 2827, S. GOMES BRITO coll., 4.II.1945 [A. E. E. det.], "atacando mudas de *Eucalyptus*". *Pirassununga*: n.º 3064, D. BRAZ coll., 28.IX.1947, "em detritos orgânicos, no solo". *Jacareí*: n.º 3312, R. L. ARAUJO coll., 27.II.1951. *São José dos Campos*: n.º 3846, A. SANCHES coll., 27.V.1953, "atacando" *Eucalyptus*".

39 — *Syntermes praecellens* SILVESTRI, 1945

SILVESTRI estudou esta espécie nos terrenos onde se acha hoje o término da pista do aeroporto de Congonhas, no bairro do Jabaquara, na capital de São Paulo. Depois da descrição original, há na literatura somente a referência de SNYDER (1949: 259) que registra 1946 como data da publicação; as separatas do trabalho de SILVESTRI, que consultamos, trazem a nota "publicato il 12 Dicembre 1945".

São Paulo: n.º 2945, F. SILVESTRI coll. et det., 9.X.1937 (êste material topotípico e metatípico pertence, sem dúvida, ao lote original estudado por SILVESTRI); — n.º 2949, OLIVEIRA FILHO coll., 8. V.1933 (parque do Hospital Emílio Ribas) [A. E. E. det.]; — n.º 3827, E. X. RABELLO coll., III.1955 (Instituto de Botânica, Água Funda), "coluna de cupins em marcha, sobre o solo; dia úmido e céu encoberto". *Atibaia*: n.º 2929, R. L. ARAUJO coll., 19.III.1946.

40 — **Syntermes silvestrii* HOLMGREN, 1911

Espécie do Paraguai, Argentina e Mato Grosso, que encontramos agora em São Paulo.

Tatuí: n.º 3221, J. P. FONSECA coll., VIII.1950, "atacando folhas de abacaxizeiro" [*Ananas* sp.] .

41 — *Syntermes wheeleri* EMERSON, 1945

E' abundante nos arredores da cidade de São Paulo, e futuras coleções indicarão, com toda certeza, mais larga distribuição geográfica dessa espécie, eis que ocorre também no Rio de Janeiro (EMERSON) e em Minas Gerais.

Hóspedes: *Iheringocantharus ypiranganus* BERNH., 1912; *Termitophagus synterminus* SILV., 1945; *Termitoplus grandis* SILV., 1945 [Col., Staphylinidae] e outros mencionados abaixo. Nosso material n.º 3372 havia sido erradamente determinado por nós como *S. dirus* o que levou SEEVERS (1957: 282) a incluí-lo como hospedeiro de *Termitoplus grandis*.

São Paulo: n.º 2997, R. L. ARAUJO coll., II.1944 [A. E. E. det.], exemplares colhidos em canais que afloravam no amontoado de terra de um saueiro (ninho de *Atta* sp., Hym., Formicidae); — n.º 3224, R. L. ARAUJO coll., 26.IX.1950 (Interlagos), ninho no campo limpo, em cômodo saliente e arredondado; — n.º 3259, R. L. ARAUJO coll., 31.X.1950 (Morumbi) [A. E. E. rev. det.], nas galerias do ninho em que foi colhida essa amostra, encontramos os seguintes hóspedes: Staphylinidae — 5 spp. (20, 11, 2, 1 e 1 expls. respectivamente): Pselaphidae — 2 spp. (11 e 5 expls. respectivamente): Phoridae (Dipt.): 1 expl. de *Ecitoptera* sp. (T. BORGMEIER det.); — n.º 3318, J. F. PRADO coll., 20.III.1951 (Morumbi), “ninho no campo”; — n.º 3362, R. L. ARAUJO coll., 5.VI.1951 (Interlagos); — n.º 3363, R. L. ARAUJO coll., 11.VI.1951 (interlagos); — n.º 3370, R. L. ARAUJO coll., 26.VI.1951 (Congonhas); — n.º 3372, R. L. ARAUJO coll., 3.VII.1951 (Congonhas); — n.º 3383, W. MALUF coll., 31.VII.1951 (Vila Primavera); — n.º 3831, R. L. ARAUJO coll., 28.IV.1953 (Água Funda); — n.º 4331, R. L. ARAUJO coll., 6.X.1953; — n.º 3841, V. AUTUORI coll., 20.VI.1953 (ARTUR ALVIM). São Miguel Paulista: n.º 3261, R. L. ARAUJO coll., 31.X.1950 [A. E. E. rev. det.], no ninho onde foi colhida essa amostra, à beira da estrada, em uma pastagem, encontramos os seguintes hóspedes: Formigas; 3 spp. de Pselaphidae (14, 3 e 7 expls. respectivamente) e 17 Staphylinidae.

Termitinae

Gênero *Dentispicotermes*

Este gênero compreende duas espécies, *D. globicephalus* (SILV., 1901) do Mato Grosso e *D. n. sp.*, de Tatuí, SP (n.º 2769, R. L. ARAUJO coll., 5.II.1945, em um ninho de *Armitermes euamignathus* (SILV.).

42 — *Neocapritermes opacus* (HAGEN, 1858)

É a única das 9 espécies descritas que se encontra em São Paulo.

São Paulo: n.º 2445, R. L. ARAUJO coll., 20.VIII.1944 [A. E. E. det.], em um grande ninho de terra, no solo de campo, em que havia ainda *Armitermes festivellus* e *Curvitermes* n. sp.; — n.º 3070, R. L. ARAUJO coll., 8.X.1947 (Ibirapuera), de um olheiro no solo, em uma chácara, saíam soldados e operários do cupim que eram atacados por formigas (*Euponera* sp., Hym., Formicidae, Ponerinae). As formigas, quando conseguiam segurar um cupim firmemente, com as mandíbulas, dobravam imediatamente o abdômen, picavam-no com o agulhão e em seguida transportavam-no para um olheiro situado a ca. 5 m de distância. Os cupins mortos e transportados eram depositados em largas galerias subterrâneas; freqüentemente o cupim, defendendo-se, atirava o atacante até a 20 cm de distância; — n.º 3126, R. L. ARAUJO coll., 19.IX.1948, vôo de colonização às 17,30 hs., de um dia muito quente e abafado; alados foram colhidos durante a revoada e junto com soldados e operários nos orifícios de saída em um ninho de terra, no campo; — n.º 3216, J. F. PRADO coll., 16.V.1950. *Santo Amaro*: n.º 3243, R. L. ARAUJO coll., 8.X.1950 (Parada Pouso Alegre), em jardim de uma residência, no meio de um gramado, onde não se via nenhum sinal de ninho, abriram-se numerosos orifícios por onde escapavam os alados (16,30 hs.) em grande número e onde se achavam também os operários e soldados; dia claro, moderadamente quente, céu limpo. *Piracaia*: n.º 2516, D. BRAZ coll., s/d., “em eucalíptal, em canais subterrâneos”. *Lins*: n.º 2655, R. L. ARAUJO coll., 24.XI.1944, sob tronco seco, em galerias superficiais no solo, terreno de cultura. *São Manoel*: n.º 2719, J. F. PRADO coll., 11.I.1945, “sob balaies com mudas de cafeeiro”. *Iepê*: n.º 2964, R. L. ARAUJO coll., 4.IX.1946, em galerias superficiais sob tôco seco, no solo de uma derrubada.

Gênero *Orthognathotermes*

Das cinco espécies descritas nesse gênero, uma está catalogada para o Brasil (Mato Grosso e Rio Grande do Sul). No Estado de São Paulo o agrupamento está representado por uma nova espécie abundante nos arredores da Capital.

43 — **Spinitermes brevicornutus* (DESNEUX, 1904)

O gênero, com quatro espécies descritas, é constatado pela primeira vez no Estado de São Paulo. *S. brevicornutus*, da Bolívia, Paraguai e Mato Grosso, ocorre também nas seguintes localidades:

São Paulo: n.º 2349, J. V. PUPO NOGUEIRA coll., 10.VIII.1944 [A. E. E. det.]; — n.º 3551, R. L. ARAUJO coll., 10.VIII.1944 [A. E. E. det.]: — n.º 3290, R. L. ARAUJO coll., 20.II.1951 (Jabaquara). *Pirassununga*: n.º 3875, D. BRAZ coll., 28.IX.1947, em ninho de *Armitermes festivellus* (3066). *Jarinu*: n.º 3879, V. AUTUORI coll., 2.III.1945, “em ninho que continha outras espécies” [2840, *Curvitermes* n. sp.]. *Tatui*: n.º 3882, R. L. ARAUJO coll., 6.II.1945, em ninho de *Diversitermes* n. sp. (2803) no campo.

Gênero *Termes*

Dez espécies acham-se catalogadas neste gênero, representado desde as Antilhas até a Argentina. Constatámo-lo pela primeira vez no Estado de São Paulo.

44 — **Termes nigritus* (SILVESTRI, 1901)

Novo Horizonte: n.º 2648, R. L. ARAUJO coll., 22.XI.1944 [A. E. E. det.], ninho de material extremamente rijo, em pastagem, aposto a um tronco cortado e descendo abaixo do nível do solo onde envolvia as raízes; a zona onde se concentrava a grande população de formas jovens e ovos, achava-se sob uma das raízes; os soldados são projetados à distância por efeito da ação de estalar as mandíbulas; — n.º 2649, R. L. ARAUJO coll., 22.XI.1944 [A. E. E. det.], ninho em situação semelhante à do n.º 2648. *Bauru*: n.º 3913, R. L. ARAUJO coll., 22.X.1953; — n.º 3915, R. L. ARAUJO coll., 22.X.1953.

45 — **Termes saltans* (WASMANN, 1897)

Espécie descoberta no Rio Grande do Sul e encontrada depois por BERG no Uruguai e por SILVESTRI na Argentina, Uruguai e Paraguai.

São Paulo: n.º 2513, R. L. ARAUJO coll., 9.X.1944. *São Bernardo do Campo*; — n.º 3285, W. MALUF coll., 20.XI.1950.

CONTRIBUTION TO THE BIOGEOGRAPHY OF THE TERMITES OF THE STATE OF SÃO PAULO, BRAZIL

Abstract

A faunistic list of the termites of the State of São Paulo, Brazil, is presented in this paper. Forty-five species, of which 22 are

reported for the area for the first time, are mentioned. In most cases field observations are included. The extralimital occurrences of *Cryptotermes havilandi* and *Coptotermes havilandi* in Brazil, are included in view of the economical importance of these harmful wood dwelling species.

No endemic genera were found in the State and so far, only three species seem to be confined within its boundaries, viz.: *Cornitermes villosus*, *Paracornitermes emersoni* and *Syntermes insidians*. The remainder of the species occur also in the neighbouring states, some with a very wide distribution over the Neotropics.

A brief historical sketch of the studies on Neotropical termites, physiographical data, a map, a gazetteer of the localities mentioned and a concise bibliography are included.

BIBLIOGRAFIA

Quase toda a literatura referida no texto está registrada por SNYDER, seja no Catálogo (1949), seja na Bibliografia (1956). Aachamos pois dispensável repetir aqui as indicações, uma vez que essas fontes bibliográficas são facilmente acessíveis. Alistamos somente as citações que lá não se acham.

ALLEE, W. C. & SCHMIDT, K. P. — 1951 — *Ecological Animal Geography* 2nd. ed. — John Wiley & Sons. Inc., N. York, xiii, 715 pp.

GRESSITT, J. L. — 1958 — *Zoogeography of Insects Ann. Rev. Entom.*, 3: 207-230. (Annual Reviews, Inc., Palo Alto, California, E. U. A.).

MELLO-LEITÃO, C. F. DE — 1947 — *Zoogeografia do Brasil* (2.^a ed.) Brasília-na, vol. 77 (Série 5.^a) — Biblioteca Pedagógica Brasileira. Cia. Editôra Nacional, São Paulo, 649 pp.

SEEVERS, C. H. — 1957 — *A Monograph on the Termitophilous Staphylinidae (Coleoptera)* — *Fieldiana: Zoology*, Chicago, E. U. A. vol. 40.

SETZER, J. — 1946 — *Contribuição para o estudo do clima do Estado de São Paulo. Separata atualizada do Boletim D. E. R.*, vols. IX a XI. São Paulo, 239 pp.

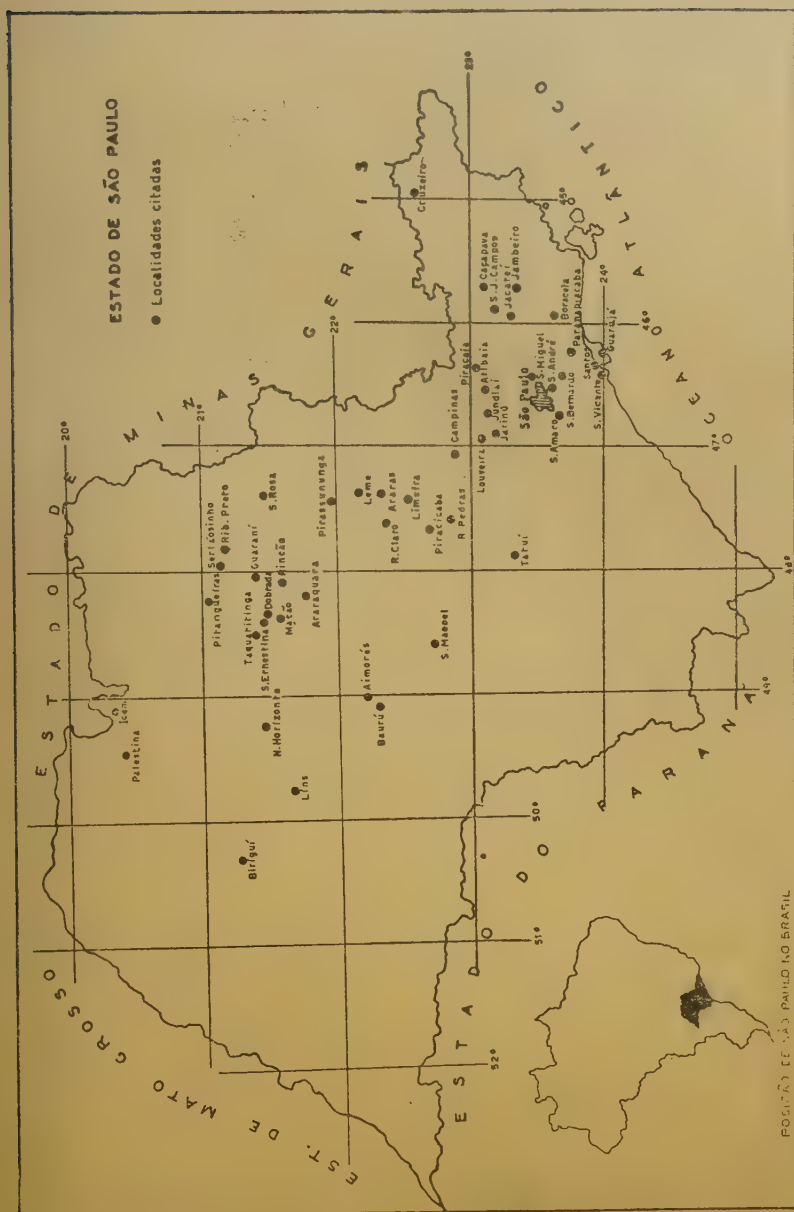
SNYDER, T. E. — 1949 — *Catalog of the Termites (Isoptera) of the World. Smiths. Misc. Coll.*, vol. 112.

SNYDER, T. E. — 1956 — *Annotated, subject-heading Bibliography of Termites. 1350 B. C. to A. D. 1954. Smiths. Misc. Coll.*, vol. 130.

APÊNDICE

Localidades mencionadas, em São Paulo e outros estados (Latitude Sul e Longitude Oeste de Greenwich.

Água Funda — Subúrbio de São Paulo	Morumbi — bairro de São Paulo
Aimorés — 22° 19' — 49° 01'	Novo Horizonte — 21° 28' 02,2" — 40° 13' 18,2"
Araraquara — 21° 47' 36,1" — 48° 10' 40,9"	Palestina — 20° 23' 24,7" — 49° 26' 05,5"
Araras — 22° 21' — 47° 23'	Paranapiacaba (ex Alto da Serra) — 23° 48' — 46° 20'
Artur Alvim — Subúrbio de São Paulo	Pinheiros — bairro de São Paulo
Assis — 22° 39' 39,5" — 50° 25' 13,2"	Piracaia — 23° 03' — 46° 21'
Atibaia — 23° 06' 50,1" — 46° 33' 06,4"	Piracicaba — 22° 42' 30,9" — 47° 38' 01,2"
Bauru — 22° 19' 18,9" — 49° 04' 13,5"	Pirassununga — 21° 59' — 47° 26'
Birigui — 21° 15' — 50° 19'	Pirituba — 23° 28' — 46° 43'
Boracéia — 23° 40' — 45° 54'	Pitangueiras — 21° 01' — 48° 13'
Caçapava — 23° 04' 50,7" — 45° 42' 37,5"	Ribeirão Preto — 21° 10' 30,6" — 47° 48' 38,5"
Campinas — 22° 53' 20,5" — 47° 04' 40,4"	Rincão — 21° 36' — 48° 05'
Congonhas — aeroporto de São Paulo	Rio Claro — 25° 23' — 47° 34'
Corcovado — montanha nos arredores do Rio de Janeiro.	Rio das Pedras — 22° 50' — 47° 37'
Cruzeiro — 22° 34' 38,8" — 44° 57' 30,5"	Rio de Janeiro, DF — 23° 18' — 43° 18'
Dobrada — 21° 32' — 48° 4'	Sacoman — bairro de São Paulo
Guarani — 21° 25' — 48° 06'	Santa Ernestina — 21° 27' — 48° 24'
Guaratiba, DF — 23° — 43,5° (aprox.)	Santa Rosa — 21° 28' — 47° 23'
Guarujá — 23° 59' 14,6" — 46° 13' 49,9"	Santo André — 23° 38' — 46° 31'
Ibirapuera — bairro de São Paulo	Santo Amaro — 23° 30' — 46° 43'
Icem — 20° 28' — 49° 11' 54,4"	Santos — 23° 57' 35,7" — 46° 19' 56,0"
Iepê — 22° 39' 50,5" — 51° 04' 32,5"	São Bernardo do Campo — 23° 42' — 46° 32'
Interlagos — subúrbio de São Paulo.	São José dos Campos — 23° 13' 53" — 45° 51' 18,5"
Ipanema — 23° 48' — 47° 36'	São Manoel — 22° 43' 49,9" — 48° 34' 11,9"
Ipiranga — bairro de São Paulo	São Miguel Paulista — subúrbio de São Paulo
Itajaí, SC — 27° 10' — 48° 48'	São Paulo — 23° 32' 35,1" — 46° 38' 0,2"
Jabaquara — bairro de São Paulo	São Vicente — 23° 58' — 46° 23'
Jacareí — 23° 17' 49,2" — 45° 58' 09,4"	Sertãozinho — 21° 09' — 47° 59'
Jambeiro — 23° 15' 15,3" — 45° 41' 24,3"	Taquaritinga — 21° 24' 43,2" — 48° 29' 54,1"
Jaraguá, SC — 26° 30' — 49° 13'	Tatui — 23° 21' 03,1" — 47° 50' 53,3"
Jarinu — 23° 06' — 46° 44'	Tijuca — bairro do Rio de Janeiro
Jundiá — 23° 10' 56,5" — 46° 53' 29,9"	Vila Formosa — bairro de São Paulo
Leme — 22° 12' — 47° 22'	Vila Primavera — bairro de São Paulo
Limeira — 22° 35' 51,8" — 47° 28' 17,5"	
Louveira — 23° 05' — 46° 54'	
Manguinhos — subúrbio do Rio de Janeiro	
Marsilack — 23° 55' — 47° 16'	
Matão — 21° 36' 10" — 48° 22' 03,7"	



CONTRIBUIÇÃO A BIOGEOGRAFIA DOS TÉRMITAS DE MINAS GERAIS, BRASIL

INSECTA — ISOPTERA (*)

POR

R. L. Araujo

Do Instituto Biológico de São Paulo

Com 1 mapa

INTRODUÇÃO

Os poucos naturalistas, antigos ou atuais, que em Minas Gerais recolheram material de Isoptera, fizeram-no de maneira fragmentária e de ninguém se sabe haver colecionado intensa e extensamente, donde a parcimônia desta lista faunística. Menciona a literatura 15 espécies, às quais agregamos mais 16 (precedidas na lista por um asterístico *), mas o total de 31 continua irrisório, considerada a extensão e a diversidade de ambientes daquele estado.

JOÃO NATTERER, êsse famoso naturalista austriaco, membro da expedição científica que acompanhou o séquito da princesa Leopoldina d'Áustria, chegou ao Brasil em 1817. Durante os 18 anos de residência realizou extensas viagens e colecionou considerável acêrvo de espécimes zoológicos de vários grupos, inclusive mais de trinta milheiros de insetos (Cf. MELLO-LEITÃO, 1941: 267-270). No estado de Minas Gerais visitou poucas localidades da zona denominada Triângulo e aí não consta haja colecionado cupins. O lugar Caiçara (ou Caissara) de onde proveio material de *Syntermes* por êle coligido (Cf. EMERSON, 1945: 454, 462), não se acha em Minas Gerais, mas em Mato Grosso e trata-se de uma antiga fazenda de criação de gado, localizada na junção dos rios Jauru e Paraguai (Circa 16° 30' S e 57° 40' W. G.) onde NATTERER residiu aproximadamente um ano (Cf. PELZELN, 1883: 126). Não consta do itinerário dêsse esplêndido colecionador nenhuma outra menção ao topônimo Caiçara, aliás aplicado a cerca de 75 outras localidades em vários estados do Brasil.

Em Lagôa Santa residiu por muitos anos (1835-1880) o naturalista PEDRO GUILHERME LUND (Cf. MELLO-LEITÃO, 1937: 270-2) famoso pelas suas pesquisas paleontológicas. Êle próprio e seus colaboradores reuniram vultoso material biológico, inclusive cupins.

(*) Recebido para publicação em 18 de dezembro de 1958.

JOÃO TEODORO REINHARDT aqui esteve como zoólogo da expedição dinamarquesa da corveta "Galatea" (1846-7) e colecionou em Lagôa Santa (Cf. WARMING, 1892: 10; MELLO-LEITÃO, 1937: 271; 1941: 309) o material que serviu a GUILHERME SÖRENSEN (1880: 23-4) para descrever o seu "*Termes lacus sancti*" (= *Neocapritermes opacus*) e a SCHIODTE para descrever curiosíssimos termitófilos (1856). GERMANO BURMEISTER chegou ao Brasil em 1850 e aqui permaneceu até princípios de 1852; colecionou nos arredores do Rio de Janeiro e em Nova Friburgo, mas suas viagens levaram-no principalmente ao estado de Minas Gerais onde, de junho de 1851 até fins do mesmo ano, permaneceu em Lagôa Santa e Congonhas (Cf. BURMEISTER, 1853) donde provém a mór parte do material de cupins que coligiu e que é mencionado por HAGEN.

A Expedição THAYER, chefiada por LUÍS AGASSIZ, veio ao Brasil em 1865. (Cf. MELLO-LEITÃO, 1941: 174 et seg.). Aqui os naturalistas dividiram-se, tendo um grupo subido pelo litoral até São Mateus, E. S. Depois de explorarem vários lugares do Espírito Santo e de Minas Gerais, HARTT, COPELAND e SHIEBER foram à localidade então denominada "Philadelphia" [hoje cidade de Teófilo Otoni] e daí rumaram para "Calhau" [hoje Arassuaí], no rio dêste nome, tendo feito um "desvio por Alaú até o Alto dos Bois para o estudo... das chapadas" (Cf. MELLO-LEITÃO, 1941: 176). O material que serviu a SNYDER para descrever o seu *Heterotermes longiceps* proveio, segundo o rótulo original ("between Philadelphia and Alahó") dessa zona que se acha aproximadamente entre 41° 30' — 42° 12' W e 17° 35' — 17° 52' S. JAIME CHESTER BRADLEY e R. G. HARRIS, assistente voluntário, foram membros da expedição entomológica da Universidade de Cornell, E. U., à América do Sul, em 1919-20 (Cf. CROSBY, 1920). A comitiva, em companhia de ADOLFO LUTZ, o famoso naturalista do Instituto Oswaldo Cruz, do Rio de Janeiro, dirigiu-se a Pirapora e em seguida demorou-se em Lassance de onde provém o material de algumas espécies de cupins coligidos por BRADLEY e HARRIS.

Há um colecionador de material zoológico por nome JOSÉ BLASER que, segundo informação que agradeço ao Dr. AFRÂNIO DO AMARAL, trabalhava para um médico do Rio de Janeiro e fornecia material biológico a várias entidades científicas, inclusive ao Museu de Zoologia Comparada, de Harvard, E. U., onde se acham espécimes de *Syntermes* provenientes de Barro Alto, localidade que EMERSON (1945: 462, 469) não conseguiu situar com precisão. Segundo informa OLIVEIRA PINTO (1952: 13), êsse colecionador alemão vendeu, em 1932, ao então Museu Paulista (hoje Departamento de Zoologia da Secre-

taria da Agricultura de São Paulo) um lote de aves provenientes do Rio Pandeiros, afluente da margem esquerda do São Francisco (15° 37' S e 44° 35' W. G.). O Dr. AFRÂNIO DO AMARAL aduz ainda que BLASER, de fato, percorreu o vale do Rio Pandeiros até suas cabeceiras e seguiu daí para Goiás. Em Minas Gerais 6 pequenas localidades têm o nome de Barro Alto, sendo uma delas no município de Januária, cuja sede está a 15° 29' 26" S. e 44° 21' 34" W. G., como se vê, bastante próxima da embocadura do Pandeiros. Dada essa coincidência e mais a data da coleta das aves e dos cupins (fins de 1931), queremos crer localizar-se nessa zona o Barro Alto onde BLASER obteve o material de *Syntermes* e não onde sugere o prezado mestre Prof. A. E. EMERSON (l. c.).

FELIPE SILVESTRI (Cf. RUSSO, 1949) realizou em 1937 uma excursão ao estado de Minas, em companhia de JOSÉ PINTO DA FONSECA, do Instituto Biológico de São Paulo. Vindos os dois naturalistas da Bahia, desembarcaram em Vitória, E. S., penetraram em Minas Gerais, demoraram-se em Benedito Valadares durante 4-5 dias e prosseguiram viagem em demanda de Belo Horizonte, donde partiram a visitar Lagôa Santa e a Serra do Cipó. O material de térmitas procedente dessa localidade não foi todo estudado por SILVESTRI que se limitou a descrever alguns termitófilos. Constan ainda na literatura como coletores de térmitas em Minas Gerais: T. IVANAUSKAS que, em 1931, recolheu uma fêmea e um soldado de *Syntermes molestus* em Paracatu, para o Museu Britânico (Cf. EMERSON, 1945: 469) e um Dr. STEPHAN (sic) que colecionou soldados de *S. dirus* em "Minas Gerais" (Cf. HAGEN, 1858: 156). Sobre êsses dois últimos colecionadores não dispomos de informações.

Há alguns anos vimos reunindo térmitas de várias localidades do estado de Minas Gerais, especialmente nos períodos de férias, e já temos acumulado considerável material depositado na coleção do Instituto Biológico. As estações de coleta donde provêm o material até agora estudado, acham-se arroladas mais adiante. A presente contribuição vale como uma primeira achega ao conhecimento da fauna termitológica dêsse grande estado. Mencionamos os estafilínidas hóspedes, por nós colecionados, que já foram identificados por C. H. SEEVERS (1957).

DADOS FISIOGRAFICOS

O Estado de Minas Gerais, com a área de 581.975 quilômetros quadrados, situa-se entre os seguintes pontos extremos: 14° 14' 06" — 22° 54' S. e 39° 52' 06" — 51° 02' 48" W. G. Zoogeograficamente acha-

se na subregião *Brasiliana* e seu território participa das três províncias seguintes: a) *Cariri-Bororo*, que abrange grande área do estado, abarcando toda a bacia do São Francisco; b) *Tupi*, que compreende as bacias do Pardo, do Jequitinhonha, São Mateus, Doce e Paraíba do Sul; c) *Guarani* que, em Minas Gerais, entra como uma cunha entre a Cariri-Bororo e a Tupi (Cf. MELLO-LEITÃO, 1947: 510, 535, 555). Ocorre no território de Minas Gerais grande diversidade de formações florísticas (Cf. MENDES MAGALHÃES, 1955; MELLO BARRETO, 1942), de climas (Cf. SILVEIRA, 1929: 156) e formações geológicas (Cf. MURTA, 1946; LESTER, 1956). Para o estudo do aspecto físico geral do território em questão, recomenda-se a leitura dos trabalhos de SILVEIRA e HARTT.

LISTA DOS CUPINS DO ESTADO DE MINAS GERAIS

KALOTERMITIDAE

1 — **Neotermes fulvescens* (SILVESTRI, 1901)

Nenhuma espécie de *Neotermes* havia ainda sido encontrada em Minas Gerais. *N. fulvescens*, do Mato Grosso e Paraguai, foi obtida em:

Belo Horizonte: n.º 4035, R. L. ARAUJO coll., 31.XII.1953 (bairro do Carmo, 995 m alt.), colônia em zona morta, extremamente úmida de velha mangueira (*Mangifera*).

2 — **Rugitermes rugosus* (HAGEN, 1858)

Conhecida do Rio de Janeiro, São Paulo, Argentina e Uruguai, a espécie foi encontrada em:

Belo Horizonte: n.º 4033, R. L. ARAUJO coll., 30.XII.1953 (bairro do Carmo, 995 m alt.), em madeira seca, rija, do interior de uma grande cicatriz proveniente do corte de galho de velha mangueira; n.º 4092, 10.I.1954 (bairro do Carmo, 995 m alt.), em zona seca de coto de galho de mangueira.

RHINOTERMITIDAE

Heterotermittinae

3 — *Heterotermes longiceps* (SNYDER, 1924)

Do Paraguai, Mato Grosso, São Paulo e Minas Gerais donde proveio o material estudado por SNYDER, coletado pela expedição

THAYER, entre "Philadelphia e Alahó". Vide nota sobre a localidade na introdução.

Vespasiano: n.º 3296, R. L. ARAUJO coll., 16.I.1951. Lagôa Santa: n.º 4089, R. L. ARAUJO coll., 7.I.1954, colônia em tóco seco de grande árvore. *Belo Horizonte*: n.º 3429, R. L. ARAUJO coll., 26.XII.1952; n.º 3431, R. L. ARAUJO coll., 31.XII.1952; n.º 3874, R. L. ARAUJO coll., 25.VII.1947, em ninho de *Armitermes euamignathus* (3032); n.º 4019, R. L. ARAUJO coll., 26.XII.1953 (Serra do Curral, 1.100 m alt.), campo que sucedeu cerrado destruído, solo de ganga ferroso; o *Heterotermes* estava em um ninho de *Diversitermes* sp., encostado a uma pedra, ocupando as espécies zonas diferentes; n.º 4031, R. L. ARAUJO coll., 30.XII.1953 (bairro do Carmo, 995 m alt.), em um ninho de *Anoplotermes* sp., de terra, à margem de um barranco; as populações das duas espécies não se misturavam, a do *Heterotermes* ocupava células amplas ligadas por galerias do diâmetro de um lápis; células e galerias estavam revestidas por substância esbranquiçada, que lembrava um bolor e idêntica à que foi observada em galerias da mesma espécie de cupim em Lagôa Santa; — n.º 4036, R. L. ARAUJO coll., 30.XII.1953 (bairro do Carmo, 995 m alt.), colônia instalada em zona seca, rija, de mangueira viva.

4 — *Heterotermes tenuis* (HAGEN, 1858)

Espécie de larga distribuição em toda a região neotropical. No Brasil já havia sido assinalada no Pará, Mato Grosso e São Paulo.

São Sebastião do Paraíso: n.º 2823, R. L. ARAUJO coll., 23.II.1945 [A. E. E. det.], em galerias de um grande ninho abandonado, aparentemente de *Cornitermes*, em companhia de outras espécies de cupins e algumas formigas. *Piraporinha*: n.º 3131, C. R. GONÇALVES coll., 22.XI.1948, "entre casca e lenho de tronco derrubado".

TERMITIDAE

A m i t e r m i t i n a e

5 — *Anoplotermes bequaerti* SNYDER et EMERSON, 1949

Da Argentina, Paraguai e São Paulo, foi agora encontrada em:

Serra do Cipó (Alto do Palácio): n.º 4044, R. L. ARAUJO coll., 2.I.1954, em campo perfeitamente limpo, no topo da serra.

6 — [*Anoplotermes turricola* SILVESTRI, 1901]

Espécie do Mato Grosso, assinalada em Lagôa Santa, MG., por SILVESTRI (1946) que expressou dúvida quanto à identificação. Não havendo examinado material que pudéssemos atribuir a essa espécie, registramo-la para Minas Gerais com a mesma dúvida.

7 — [*Microcerotermes arboreus* EMERSON, 1925]

De larga distribuição na América Central, Guianas, ilhas das Antilhas, foi encontrada na Bolívia e assinalada no Brasil por HAGEN que a registra para Congonhas, segundo material colecionado por BURMEISTER. No itinerário desse ilustre naturalista, em sua viagem ao Brasil, a única localidade com tal nome situa-se em Minas Gerais e é por isso que incluímos a espécie nesta lista, na esperança de retificação ou confirmação da identidade à vista de material. Aliás, nem só a discrepância na distribuição geográfica, mas a observação de HAGEN 1858: 207) a respeito de "*T. debilis* HEER" (= *arboreus*) do qual aliás só conheceu alados, faz duvidar da presença da espécie em Minas Gerais: "Das einzige schlecht erhaltene Stück aus Congonhas is noch schlanker, doch rühren die Differenzen wohl nur vom Eintrocknen".

Nasutitermitinae

8 — *Constrictotermes cyphergaster* (SILVESTRI, 1901)

SILVESTRI colheu seu material original em Mato Grosso e registrou a espécie em 1946 para Minas Gerais (Lagôa Santa) e São Paulo, ao tratar de termitófilos.

Piraporinha: n.º 3132, C. R. GONÇALVES coll., 22.XI.1948, "ninho encostado a uma árvore". *Rio Pardo de Minas*: n.º 3410, R. L. ARAUJO coll., 10.I.1952, ninho arborícola, com diversos estafilí-nidas hóspedes e uma espécie de *Termes* (4252); — n.º 3412, R. L. ARAUJO coll., 10.I.1952. *Montezuma*: n.º 3414, R. L. ARAUJO coll., 12.I.1952, no mesmo ninho encontrou-se *Termes* sp. (4257), *Montes Claros*: n.º 3416, R. L. ARAUJO coll., 8.I.1952; — n.º 3417, R. L. ARAUJO coll., 8.I.1952; — n.º 3418, R. L. ARAUJO coll., 8.I.1952 — n.º 3421, R. L. ARAUJO coll., 8.I.1952. Hóspedes: *Corotoca melantho* SCHIODTE, 1854; *Corotoca phylo* SCHIODTE, 1854; *Corotoca araujo* SEEVERS, 1957; *Termiticola silvestrii* (WASMANN, 1902) [Coleoptera, Staphylinidae].

9 — *Cornitermes bequaerti* EMERSON, 1952

Já registrada para Minas Gerais por EMERSON que estudou material colecionado por HARTT e COPELAND, membros da Expedição Thayer, perto de "Philadelphia", hoje Teófilo Otoni. Examinamos material das seguintes localidades mineiras:

Campanha: n.º 3020, R. L. ARAUJO coll., 27.VI.1947, ninho característico da espécie, instalado sobre grande ninho de *Syntermes*; — n.º 4224, R. L. ARAUJO coll., 27.VII.1954. *Monsenhor Paulo*: n.º 4208, R. L. ARAUJO coll., 22.VII.1954, ninho em pastagem; — n.º 4213, R. L. ARAUJO coll., 23.VII.1954, ninho em pastagem. *Lagôa Santa*: n.º 3211, R. L. ARAUJO coll., 29.I.1950, cerrado; — n.º 3402, R. L. ARAUJO coll., 24.I.1952, cerrado; — n.º 4075, R. L. ARAUJO coll., 7.I.1954, ninho no solo, cerrado; — n.º 4100, R. L. ARAUJO coll., 12.I.1954, ninho em pastagem, perto da gruta denominada Lapa Vermelha; — n.º 4075, R. L. ARAUJO coll., 7.I.1954. *Belo Horizonte*: n.º 3423, R. L. ARAUJO coll., 31.XII.1951; — n.º 4021, R. L. ARAUJO coll., 28.XII.1953 (Pampulha), cerrado em reconstituição.

10 — *Cornitermes cumulans* (KOLLAR, 1832)

Já arrolada para Minas Gerais por EMERSON (1952: 517) que se refere a material por nós colecionado em São Sebastião do Paraíso e a material da coleção SEEVERS, procedente de Passa Quatro. As novas localidades são:

Juiz de Fora: n.º 2964, R. L. ARAUJO coll., VI.1946; — n.º 2965, R. L. ARAUJO coll., VI.1946. *Campanha*: n.º 3003, R. L. ARAUJO coll., 24.VI.1947; — n.º 3005, R. L. ARAUJO coll., 24.VI.1947; — n.º 3017, R. L. ARAUJO coll., 27.VI.1947; — n.º 4226, R. L. ARAUJO coll., 28.VII.1954, ninho no solo, em cerrado. *Monsenhor Paulo*: n.º 4214, R. L. ARAUJO coll., 23.VII.1954, ninho em pastagem; — n.º 4220, R. L. ARAUJO coll., 23.VII.1954, ninho em pastagem. *Virgínia*: n.º 3186, R. L. ARAUJO coll., 8.IV.1949 (Fazenda dos Campos, 1.500 m alt.); — n.º 3187, R. L. ARAUJO coll., 8.IV.1949 (Fazenda dos Campos, 1.500 m alt.); — n.º 3188, R. L. ARAUJO coll., 8.IV.1949 (Fazenda dos Campos, 1.500 m alt.). *Belo Horizonte*: n.º 3029, R. L. ARAUJO coll., 25.VII.1947; — n.º 3030, R. L. ARAUJO coll., 25.VII.1947; — n.º 3031, R. L. ARAUJO coll., 25.VII.1947; — n.º 4068, R. L. ARAUJO coll., 4.I.1954, ninho no solo, largo picadão em mata; — n.º 4114, R. L. ARAUJO coll., 15.I.1954 (Pampulha). *Vespasiano*: n.º 3433, R. L. ARAUJO coll., 1.I.1952; — n.º 4116, R. L. ARAUJO coll., 16.I.1954, ninho terrícola em pastagem. *Lagôa Santa*: n.º 3209, R. L. ARAUJO

coll., 29.I.1950; — n.º 4026, R. L. ARAUJO coll., 29.XII.1953, cerrado alto; cupins em um pedaço de galho pôdre, sob e no interior úmido da casca grossa; — n.º 4028, R. L. ARAUJO coll., 29.XII.1953, ninho no solo, em cerrado alto, porém bastante ralo com relação às árvores maiores. *Santa Luzia*: n.º 3114, R. L. ARAUJO coll., 21.VII.1948; — n.º 3116, R. L. ARAUJO coll., 21.VII.1948. *Serra do Cipó*: n.º 4045, R. L. ARAUJO coll., 2.I.1954 (Alto do Palácio), em campo limpo; — n.º 4047, R. L. ARAUJO coll., 2.I.1954, campo limpo; — n.º 4049, R. L. ARAUJO coll., 2.I.1954; — n.º 4050, R. L. ARAUJO coll., 2.I.1954, campo limpo.

11 — *Cornitermes similis* (HAGEN, 1858)

Esta espécie foi baseada em material colhido por BURMEISTER em Congonhas e Lagôa Santa, MG. Em trabalho anterior (ARAUJO, 1958: 199), externamos opinião, concordante com a de EMERSON (1952: 518) de que esta espécie poderá vir a ser incluída na sinonímia de *C. cumulans* quando se puder estudar material mais adequado.

12 — **Cornitermes snyderi* EMERSON, 1952

Da Bolívia e de Goiás, esta espécie parece substituir *C. cumulans*, da qual é bastante próxima, mais ou menos do paralelo 20º para o norte, no Estado de Minas Gerais.

Pirapora: n.º 3136, C. R. GONÇALVES coll., 22.XI.1948. *Januária*: n.º 3179, C. R. GONÇALVES coll., 29.XI.1948; — n.º 3180, C. R. GONÇALVES coll., 28.XI.1948; — n.º 3182, C. R. GONÇALVES coll., 29.XI.1948; — n.º 3183, C. R. GONÇALVES coll., 29.XI.1948. *Montezuma*: n.º 3404, R. L. ARAUJO coll., 12.I.1952, ninho terrícola, em cerrado. *Montes Claros*: n.º 3420, R. L. ARAUJO coll., 8.I.1952, em cerrado.

13 — **Armitermes euamignathus* SILVESTRI, 1901

Espécie da Bolívia, Paraguai, Mato Grosso e São Paulo, encontrada agora também em Minas Gerais.

Belo Horizonte: n.º 3032, R. L. ARAUJO coll., 25.VII.1947, ninho terrícola quebradiço, de terra, em cuja parte hipógea as galerias estavam bem mais afastadas umas das outras; no mesmo ninho encontrou-se *Heterotermes longiceps* (3874) e *Spinitermes brevicor-*

nutus (4313); — n.º 3428, R. L. ARAUJO coll., 26.XII.1951; — n.º 4024, R. L. ARAUJO coll., 28.XII.1953 (Pampulha), cerrado em reconstituição espontânea, pequeno ninho de terra, quebradiço, terrícola; revestimento exterior de argila clara, o interior do ninho de côr negra; — n.º 4046, R. L. ARAUJO coll., 4.I.1954, (bairro do Carmo) em campo sujo; — n.º 4234, R. L. ARAUJO coll., 28.XII.1953 [em ninho de *Paracornitermes araujoi*, n.º 4022] (Pampulha) cerrado em reconstituição espontânea; — n.º 4317, R. L. ARAUJO coll., 4.I.1954 (bairro do Carmo) em mistura com *Orthognathotermes* sp. (n.º 4058). *Vespasiano*: n.º 3434, R. L. ARAUJO coll., 1.I.1952, em pastagem. *Lagôa Santa*: n.º 3401, R. L. ARAUJO coll., 24.I.1952, ninho de terra, quebradiço, terrícola, cerrado; — n.º 4025, R. L. ARAUJO coll., 29.XII.1953, ninho pequeno, de terra, de estrutura interna homogênea, quebradiço, à sombra do arvoredo de um cerrado verdadeiro; — n.º 4079, R. L. ARAUJO coll., 7.I.1954, ninho terrícola em cerrado; — n.º 4103, R. L. ARAUJO coll., 12.I.1954 (próximo à gruta da Lapa Vermelha), pequeno ninho de terra, com a parte epígea encostada a um tóco. *Serra do Cipó*: n.º 4042, R. L. ARAUJO coll., 2.I.1954 (Alto do Palácio) em campo limpo, no alto da serra. *Monsenhor Paulo*: n.º 4216, R. L. ARAUJO coll., 23.VII.1954, ninho terrícola em pastagem.

14 — **Armitermes festivellus* SILVESTRI, 1901

A distribuição geográfica conhecida compreende Bolívia, Mato Grosso e São Paulo. Encontramo-la em Minas Gerais, nas seguintes localidades:

São Sebastião do Paraíso: n.º 4316, R. L. ARAUJO coll., 21.II.1945 [no mesmo ninho havia exemplares de uma nova espécie de *Labiotermes* (2811)]. *Monsenhor Paulo*: n.º 4218, R. L. ARAUJO coll., 23.VII.1954, ninho terrícola em pastagem. *Belo Horizonte*: n.º 4240, R. L. ARAUJO coll., 4.I.1954 (bairro do Carmo), o material consiste em soldados encontrados no mesmo ninho com *Diversitermes* sp. (4059) e *Spinitermes* n. sp. (4060), ninho no solo, em "campo sujo". *Lagôa Santa*: n.º 4083, R. L. ARAUJO, 7.I.1954 (a 500 m ao N da lagôa), pastagem abandonada, pequeno ninho de terra no solo; em associação encontrou-se *Spinitermes* n. sp. (4310) e ao fundo do ninho descobriram-se canais donde surgiam soldados de *Syntermes molestus* (4084).

15 — **Nasutitermes aquilinus* (HOLMGREN, 1910)

Do Paraguai, Santa Catarina e São Paulo.

Campanha: n.º 2944, R. L. ARAUJO coll., XI.1945 [A. E. E. det.], ninho em uma residência, os soldados transitavam por uma passagem coberta que ligava o fôrro ao assoalho. *Arceburgo*: n.º 3385, F. DE MELLO leg., 19.VIII.1951 (Fazenda Fortaleza).

16 — **Nasutitermes bivalens* (HOLMGREN, 1910)

Do Mato Grosso e São Paulo.

Campanha: n.º 3006, R. L. ARAUJO coll., 25.VI.1947, ninho de terra no solo de pastagem: gramíneas cresciam através o ninho; galerias centrais mais rijas que as periféricas; — n.º 3009, R. L. ARAUJO coll., 25.VI.1947, ninho de terra, no solo, as galerias periféricas muito friáveis e um núcleo central de galerias mais largas e rijas. *Lagôa Santa*: n.º 3212, R. L. ARAUJO coll., 29.I.1950, ninho de terra, no solo, em cerrado; — n.º 3297, R. L. ARAUJO coll., 4.I.1951, ninho no solo, em cerrado.

17 — **Nasutitermes coxipoensis* (HOLMGREN, 1910)

Além de Mato Grosso e São Paulo, encontra-se esta espécie também em Minas Gerais.

São Sebastião do Paraíso: n.º 2814, R. L. ARAUJO coll., 21.II.1945 [A. E. E. det.], ninho de terra, no solo.

18 — **Nasutitermes feytaudi* (HOLMGREN, 1910)

Originariamente encontrada no Rio de Janeiro, esta espécie não havia sido posteriormente referida na literatura. Possuimos material de:

Diamantina: n.º 2767 e 3633, J. C. BRADLEY coll., 1919 [A. E. E. det et leg.].

19 — **Nasutitermes jaraguae* (HOLMGREN, 1910)

Espécie de Santa Catarina e São Paulo.

Vespasiano: n.º 3298, R. L. ARAUJO coll., 16.I.1951.

20 — **Nasutitermes proximus* (SILVESTRI, 1901)

Do Uruguai, Santa Catarina e São Paulo.

São Sebastião do Paraíso: n.º 2815, R. L. ARAUJO coll., 21.II.1945 [A. E. E. det.], ninho de terra, muito pequeno, no solo de campo, estrutura homogênea; — n.º 2817, R. L. ARAUJO coll., 22.II.

1945 [A. E. E. det.] (perto da estação de Ipoméia), cupins apanhados na entrada da gruta de Nova Olinda, abaixo da primeira camada de um aglomerado de guano de morcegos.

21 — *Paracornitermes hirsutus* ARAUJO, 1954

Até agora restricta ao estado de Minas Gerais, donde temos sòmente o material original de:

Monte Azul: n.º 3213, R. L. ARAUJO coll., 8.I.1950, exemplares provenientes de galerias que desembocavam sob tronco caído ao solo.

22 — *Procornitermes araujo* EMERSON, 1952

Havia na literatura sòmente uma referência a esta espécie (EMERSON, 1952: 493) que estudou material colecionado por BURMEISTER em Congonhas e determinado por HAGEN como "*T. similis*". A espécie é abundante nesse estado onde a colecionamos nas seguintes localidades:

Monsenhor Paulo: n.º 4211, R. L. ARAUJO coll., 22.VII.1954, ninho em pastagem; — n.º 4219, R. L. ARAUJO coll., 23.VII.1954, ninho em pastagem; — n.º 4221, R. L. ARAUJO coll., 23.VII.1954, ninho em pastagem; — n.º 4222, R. L. ARAUJO coll., 23.VII.1954, ninho em pastagem. *Campanha*: n.º 3012, R. L. ARAUJO coll., 26.VI.1947, ninho de terra, rijo, no solo, em pastagem; — n.º 3013, R. L. ARAUJO coll., 27.VI.1947, ninho rijo, de terra, de estrutura homogênea, com galerias largas de revestimento negro, em campo; — n.º 3015, R. L. ARAUJO coll., 27.VI.1947, ninho de terra, no solo, em campo, estrutura interna homogênea, galerias largas com revestimento negro, em sua parte hipógea uma colônia de *Diversitermes* sp. (3016); — n.º 4223, R. L. ARAUJO coll., 27.VII.1954, ninho em cerrado. *Ituiutaba*: n.º 4612, J. R. BAETA NEVES coll., VI.1950 (D. D. S. V. do Ministério da Agricultura, n.º 9102) "atacando culturas de arroz e a maioria das hortaliças da região" no caso do arroz "corta as raízes e os cachos". *Belo Horizonte*: n.º 3292, R. L. ARAUJO coll., 8.XII.1950; — n.º 3294, R. L. ARAUJO coll., 4.I.1951; — n.º 3295, R. L. ARAUJO coll., 4.I.1951; — n.º 3425, R. L. ARAUJO coll., 31.XII.1952; — n.º 3426, R. L. ARAUJO coll., 18.XII.1951; — n.º 4022, R. L. ARAUJO coll., 28.XII.1953 (Pampulha), cerrado em reconstrução espontânea, ninho rijo de centro diferenciado, onde encontraram-se mais *Spinitermes* sp. n. (4232) e *Armitermes euamignathus* (4234); — n.º 4023, R. L. ARAUJO coll., 28.XII.1953 (Pampu-

lha), cerrado em reconstituição espontânea; — n.º 4061, R. L. ARAUJO coll., 4.I.1954, em “campo sujo”; — n.º 4091, R. L. ARAUJO coll., 10.I.1954, pequeno ninho no campo; — n.º 4095, R. L. ARAUJO coll., 11.I.1954 (bairro do Carmo, 995 m alt.) ninho em barranco à margem do caminho, estrutura homogênea; — n.º 4096, R. L. ARAUJO coll., 11.I.1954 (bairro do Carmo, 995 m alt.), campo, ninho de terra, de estrutura homogênea, onde se encontravam ainda *Syntermes molestus* (4098) e *Paracornitermes* sp. (4099); — n.º 4113, R. L. ARAUJO coll., 15.I.1954 (Pampulha), ninho de terra, estrutura homogênea, em eucaliptal. *Lagôa Santa*: n.º 3403, R. L. ARAUJO coll., 24.I.1952, cerrado, grande ninho terrícola, quebradiço, de estrutura homogênea, onde havia ainda *Spinitermes* n. sp. (4309), nesse ninho encontrou-se o hóspede *Scarabaeinus termitophilus* SILVESTRI, 1940 (Col.-Aphodiidae) e nas mesmas condições, exemplares de Acantocérída (Col., Scarabaeoidea) ainda não estudados; — n.º 4027, R. L. ARAUJO coll., 29.XII.1953, pequeno ninho de estrutura uniforme, em cerrado em reconstituição espontânea; — n.º 4101, R. L. ARAUJO coll., 12.I.1954, ninho de estrutura homogênea, no solo, em pastagem (à esquerda da gruta da Lapa Vermelha).

23 — **Procornitermes triacifer* (SILVESTRI, 1901)

Espécie do Mato Grosso e São Paulo, que recebemos também de:

Piraporinha: n.º 3135, C. R. GONÇALVES coll., 22.XI.1948.

24 — **Rhynchotermes nasutissimus* (SILVESTRI, 1901)

A distribuição dessa espécie estende-se da Bolívia e Paraguai, através de Mato Grosso (Cf. SNYDER, 1949: 264) e São Paulo (ARAUJO, 1958: 209) até ao centro de Minas Gerais, conforme material que colecionamos em:

Belo Horizonte: n.º 4112, R. L. ARAUJO coll., 15.I.1954 (ao lado da estrada, logo adiante da Pampulha), em eucaliptal ralo, os exemplares foram obtidos diretamente de sob estrume de gado e em pequenas células excavadas no solo subjacente. *Lagôa Santa*: n.º 3208, R. L. ARAUJO coll., 29.I.1950; — n.º 4087, R. L. ARAUJO coll., 7.I.1954, em pastagem abandonada.

25 — *Syntermes dirus* (BURMEISTER, 1839)

Já citada para Barro Alto, MG (EMERSON, 1945: 462). HAGEN (1858: 156) refere-se a material obtido por SCHOTT, NATTERER e LUND

no “sul do Brasil”, por BURMEISTER no Rio, Congonhas e Lagôa Santa e por Dr. STEPHAN em Minas Gerais. Segundo êsse autor, NATTERER teria obtido seu material em Caiçara. Vide notas sôbre essas localidades e colecionadores na introdução.

Montezuma: n.º 3306, R. L. ARAUJO coll., 16.XII.1950; — n.º 3406, R. L. ARAUJO coll., 12.I.1952, enorme amontoado de terra, de forma cônica, em lugares limpos e orlas de matas, percorridas internamente por largas galerias; o ninho pròpriamente dito é subterrâneo; êsses aglomerados de terra em certos lugares são tão numerosos e conspícuos que chegam emprestar característico peculiar à paisagem. *Rio Pardo de Minas*: n.º 3413, R. L. ARAUJO coll., 10. I.1952.

26 — *Syntermes grandis* (RAMBUR, 1842)

EMERSON, reestudando material de Congonhas, MG, identificado por BURMEISTER como “*T. dirus*” constatou essa espécie em Minas Gerais.

27 — *Syntermes molestus* (BURMEISTER, 1839)

EMERSON arrola material de Paracatu, Barro Alto e Lassance, em Minas Gerais (1945: 469) para a distribuição de *S. molestus*. Acrescentamos agora:

Belo Horizonte: n.º 4057, R. L. ARAUJO coll., 4.I.1954 (bairro do Carmo), em campo sujo; — n.º 4063, R. L. ARAUJO coll., 4.I.1954, em campo sujo; — n.º 4094, R. L. ARAUJO, coll., 11.I.1954 (bairro do Carmo, 995 m alt.) campo com vegetação baixa e rala, ninho em “meia laranja”, i. e., com a parte epígea hemisférica e achatada, cujo interior é cruzado de galerias numerosas e onde também se encontra a criação da colônia; — n.º 4098, R. L. ARAUJO coll., 11.I. 1954 (bairro do Carmo, 995 m alt.); — n.º 4109, R. L. ARAUJO coll., 15.I.1954 (ao lado da estrada, logo adiante da Pampulha), sob estrupe de gado. *Lagôa Santa*: n.º 4084, R. L. ARAUJO coll., 7.I.1954, cerrado devastado. *Januária*: n.º 3184, C. R. GONÇALVES coll., 28. XI.1949, “cupim subterrâneo”. *Piraporinha*: n.º 3130, C. R. GONÇALVES coll., 22.XI.1948, “ninho em amontoado de terra”. *Montes Claros*: n.º 4329, R. L. ARAUJO coll., 8.I.1952, soldados que apareceram no ninho de terra rijo, no campo, de *Procornitermes* sp. (3415). *Montezuma*: n.º 3305, R. L. ARAUJO coll., 16.XII.1950; — n.º 3408, R. L. ARAUJO coll., 12.I.1952, ninho de terra, rijo, na orla da mata,

além do *Syntermes*, havia ainda *Labiotermes* sp. (4336) e *Paracornitermes* sp. (4308).

28 — **Syntermes wheeleri* EMERSON, 1945

Espécie de São Paulo e Rio de Janeiro que agora registramos para Minas Gerais.

Campanha: n.º 3019, R. L. ARAUJO coll., 27.VI.1947, grande ninho de terra, em pastagem; numerosas galerias logo abaixo do revestimento externo; grande quantidade de fragmentos de gramíneas armazenadas nas galerias; — n.º 4227, R. L. ARAUJO coll., 28.VII.1954, ninho em cerrado. *Belo Horizonte*: n.º 4020, R. L. ARAUJO coll., 28.XII.1953 (logo adiante da Pampulha), ninho em cerrado em reconstituição; — n.º 4111, R. L. ARAUJO coll., 15.I.1954, (logo adiante da Pampulha) ninho em eucaliptal ralo. *Lagôa Santa*: n.º 4073, R. L. ARAUJO coll., 7.I.1954, cerrado, ninho em “meia laranja”.

29 — *Syntermes chaquimayensis chaquimayensis* (HOLMGREN, 1906)

EMERSON (1945: 449) inclui, com dúvidas, nesta espécie do Peru, um exemplar colhido em “Philadelphia” por membros da Expedição Thayer. Consignamo-la aqui, até melhor esclarecimento da questão.

T e r m i t i n a e

30 — *Neocapritermes opacus* (HAGEN, 1858)

Originalmente procedente de Lagôa Santa, MG., esta espécie tem larga distribuição geográfica, eis que vai para o sul, passando por São Paulo (ARAUJO, 1958: 212), Paraná, Santa Catarina, até Argentina, e para oeste até Paraguai, Mato Grosso e Bolívia.

Belo Horizonte: n.º 3033, R. L. ARAUJO coll., 25.VII.1947, pequeno ninho de terra, cônico, quebradiço, no campo.

31 — **Spinitermes brevicornutus* (DESNEUX, 1904)

O gênero *Spinitermes* conta, em Minas Gerais, com duas novas espécies indescritas, além de *brevicornutus* do Paraguai, Bolívia e Mato Grosso, que encontramos em:

Belo Horizonte: n.º 4313, R. L. ARAUJO coll., 25.VII.1947, em ninho de *Armitermes euamignathus* (3032) onde havia também *Heterotermes longiceps* (3874).

Termes sp.

Este gênero não havia ainda sido constatado em Minas Gerais. Há em nossa coleção um soldado proveniente de Montezuma (4257), encontrado em colônia de *Constrictotermes cyphergaster*, que se mostra extremamente próxima de *T. inquilinus* EMERSON, 1925, da Guiana Inglesa e que vive em associação com *Constrictotermes cavifrons*. Por deficiência de material que permita avaliar devidamente as pequenas diferenças morfológicas observadas entre nosso material e *inquilinus* e dada também a discrepância na distribuição geográfica, deixamos para melhor oportunidade a identificação específica.

CONTRIBUTION TO THE BIOGEOGRAPHY OF THE TERMITES
OF THE STATE OF MINAS GERAIS, BRAZIL

Abstract

A faunistic list of the Termites of the State of Minas Gerais, Brazil, is presented. Thirty-one species, of which 16 are reported for the area for the first time, are mentioned. In many cases field observations are included.

No endemic genera were found in the State and, so far, only Cornitermes similis and Paracornitermes hirsutus seem to be confined within its boundaries. The remainder of the species occur also in the neighbouring States, some with a very wide distribution over the subregion.

A brief historical reference to the collectors of Isoptera in Minas Gerais, physiographical data, a gazetteer of the localities mentioned and a concise bibliography are included.

BIBLIOGRAFIA

Enumeram-se aqui os trabalhos referentes a questões históricas e a aspectos fisiográficos. O asterístico indica os que contém bibliografia concernente à região considerada. Toda a literatura sistemática acha-se em SNYDER, 1949 e 1956.

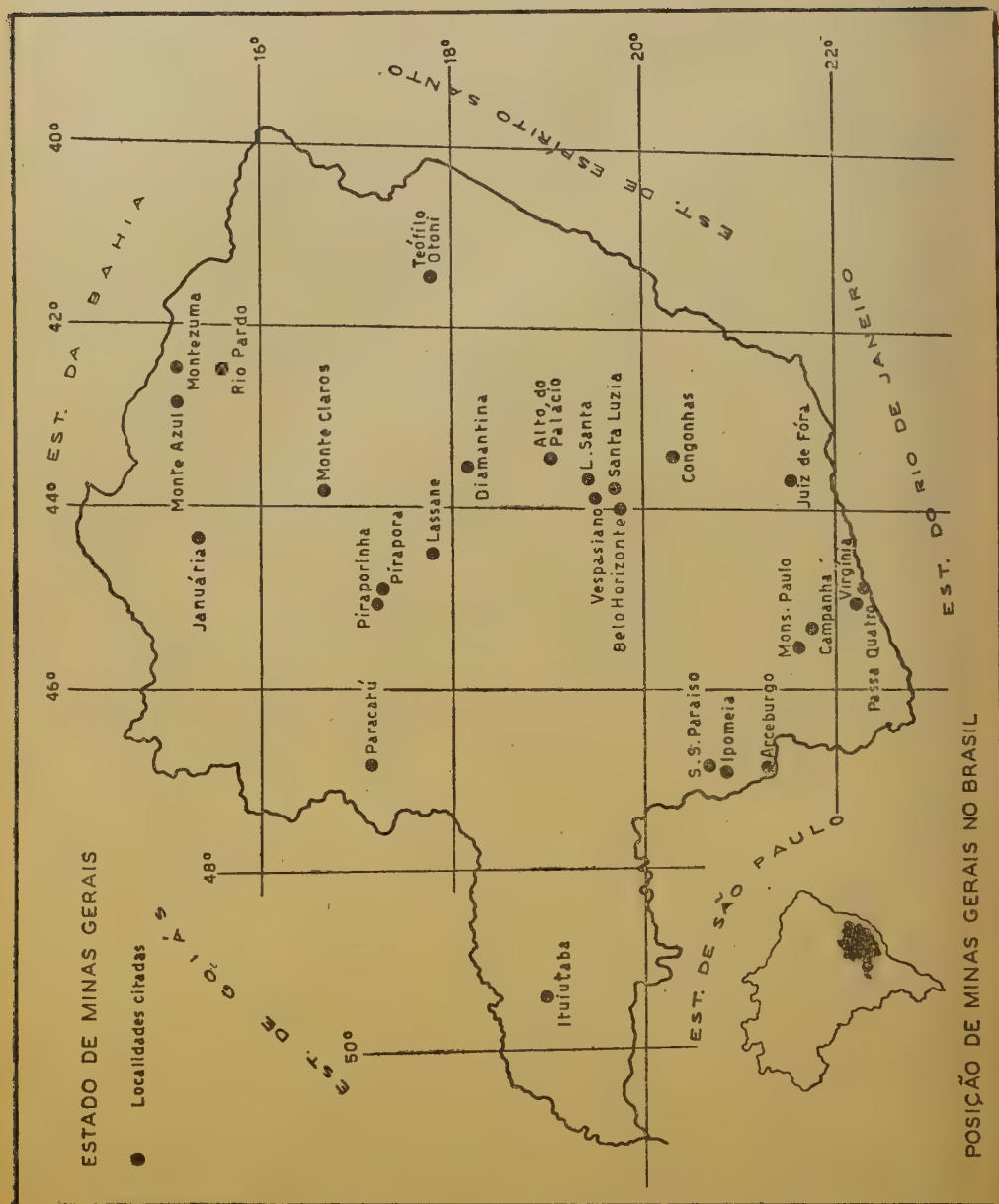
- ARAUJO, R. L. — 1954 — Notes on the genus *Paracornitermes* EMERSON, 1949, with the description of two new species (Isoptera, Termitidae, Nasutitermitinae). *Rev. Brasil. Ent.*, São Paulo, 1: 181-189, 5 figs.
- ARAUJO, R. L. — 1958 — Contribuição à Biogeografia dos térmitas de São Paulo, Brasil. *Insecta-Isoptera. Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 25: 185-218.
- BURMEISTER, H. — 1853 — Reise nach Brasilien durch die Provinzen von Rio de Janeiro und Minas Geraes..., Berlin, Reimer, 8 + 608 pp., 1 mapa. [Tradução portuguesa de Manoel Salvaterra e Hubert Schoenfeldt, São Paulo, 1952, Livraria Martins, 341 pp., ilustr. Bibliot. Hist. Brasil., vol. 19].
- CROSBY, C. R. — 1920 — The Cornell University Entomological Expedition to South America of 1919-20. *Ent. News*, Philadelphia, 21: 139-140.
- HARTT, C. F. — 1870 — Geology and Physical Geography of Brazil. Fiel, Osgood & Co., Boston, E. U. [Tradução portuguesa de E. S. Mendonça e E. Donianiti, São Paulo, 1941, Comp. Edit. Nacional].
- *KING, LESTER C. — 1956 — A Geomorfologia do Brasil Oriental. *Rev. Brasil. Geogr.*, Rio de Janeiro, 18 (2): 147-265, ilustr.
- *MELLO BARRETO, H. L. — 1942 — Regiões Fitogeográficas de Minas Gerais. *Dept. Geogr. Est. Minas Gerais, Bol.* 4, 30 pp., bibliogr.
- MELLO-LEITÃO, C. F. — 1937 — A Biologia no Brasil. São Paulo, Cia. Edit. Nacional, 331 pp. [Bibl. Pedag. Brasil., sér. 5.^a, Brasileira, vol. 99].
- MELLO-LEITÃO, C. F. — 1941 — História das Expedições Científicas no Brasil. São Paulo, Cia. Edit. Nacional, 360 pp. [Bibl. Pedag. Brasil., sér. 5.^a, Brasileira, vol. 209].
- MELLO-LEITÃO, C. F. — 1947 — Zoogeografia do Brasil. São Paulo, Cia. Edit. Nacional, 2.^a ed., 649 pp. [Bibl. Pedag. Brasil., sér. 5.^a, Brasileira, vol. 77].
- MENDES-MAGALHÃES, G. — 1955 — Características de alguns tipos florísticos de Minas Gerais (Brasil). I. *Bol. Soc. Port. Ciênc. Nat.*, 5, 2.^a sér. (19), 2: 91-113, 3 ests.
- *MURTA, D. F. — 1946 — Literatura Geológica do Estado de Minas Gerais. 2 vols., Belo Horizonte, Secretaria da Agricultura.
- *PINTO, O. M. DE O. — 1952 — Súmula histórica e Sistemática da Ornitologia de Minas Gerais. *Arq. Zool.*, São Paulo, 8: 1-51.
- PELZELN, A. VON — 1883 — Brasilische Säugethiere. Resultate von Johann Natterer's Reisen in den Jahren 1817 bis 1835. *Verh. Zool.-Bot. Ges. Wien*, Beiheft zu Band 33: 1-140.
- RUSSO, G. — 1949 — "Filippo Silvestri". *Bol. Lab. Ent. Agr.*, Portici, 9: 1-49, foto.
- SAINT-HILAIRE, A. — 1831 — Tableau géographique de la végétation primitive dans la province de Minas Geraes. *Ann. Sci. Nat.*, Paris, 24: 64-102.

- SEEVERS, C. H. — 1957 — A Monograph on the termitophilous Staphylinidae (Coleoptera) *Fieldiana: Zoology*, Chicago, 40: 1-334.
- SILVEIRA, A. A. DA — 1929 — Geographia do Estado de Minas. Belo Horizonte, Oliveira Costa, 303, xxii pp., ilustr.
- SNYDER, T. E. — 1949 — Catalog of the Termites (Isoptera) of the World. *Smiths. Misc. Collect.*, Washington, 112: 1-490.
- SNYDER, T. E. — 1956 — Annotated, subject-heading bibliography of Termites, 1350 B. C. to A. D. 1954. *Smiths. Misc. Collect.*, Washington, 130: 1-305.
- *WARMING, E. — 1892 — "Lagôa Santa". *K. Danske Vid. Selsk. Skr.*, 6: 159-488, ilustr. [Tradução portuguesa de A. Loeffgren, 1908, Belo Horizonte, Imprensa Oficial do Estado de Minas Geraes].

APÊNDICE

Lista das localidades mencionadas (latitude Sul e longitude Oeste de Greenwich)

Alaú (Alahó) — vide introdução, p. 220	Monte Azul — 15° 16' 05" — 42° 36' 09"
Alto do Palácio — 19° 16' — 43° 32'	Montes Claros — 16° 43' 04" — 43° 13' 07"
Arceburgo — 21° 22' — 40° 57'	Montezuma — 15° 12' — 42° 30'
Barro Alto — vide introdução, p. 220-221	Pampulha — bairro de Belo Horizonte
Belo Horizonte — 19° 50' 36" — 43° 56' 57"	Paracatu — 17° 13' 10" — 46° 52' 34"
Caiçara (Caissara), MT — 16° 20' — 57° 40'	Passa Quatro — 22° 23' 28" — 44° 57' 44"
Campanha — 21° 50' 14" — 45° 23' 58"	"Philadelphia" — vide Teófilo Otoni
Carmo — bairro de Belo Horizonte	Pirapora — 17° 21' 08" — 44° 53' 55"
Congonhas — 20° 30' — 43° 55'	Piraporinha — 17° 21' — 44° 57'
Diamantina — 18° 15' — 43° 36'	Rio Pardo de Minas — 15° 52' 23" — 42° 22' 35"
Filadélfia — vide Teófilo Otoni	Santa Luzia — 19° 46' — 42° 51'
Ipoméia — 21° 0' — 47° 0'	São Sebastião do Paraíso — 20° 54' 48" — 46° 59' 36"
Ituiutaba — 18° 58' — 49° 28'	Serra do Cipó — vide Alto do Palácio
Januária — 15° 29' 27" — 44° 21' 32"	Teófilo Otoni — 17° 56' — 41° 30' (nome que em 1878 substituiu "Philadelphia")
Juiz de Fora — 21° 46' — 43° 21'	Vespasiano — 19° 41' — 43° 56'
Lassance — 17° 54' — 44° 33'	Virgínia — 22° 19' 58" — 45° 05' 46"
Lagôa Santa — 19° 37' 28" — 43° 33' 37"	
Monsenhor Paulo — 21° 46' — 45° 26'	



POSIÇÃO DE MINAS GERAIS NO BRASIL

ATIVIDADE VITAMÍNICA B₁₂
NO RUMEN E NAS FEZES DE BOVINOS.
SUA VARIAÇÃO COM O REGIME ALIMENTAR (*)

POR

D. M. Cardoso
Da Ind. Bras. de Produtos Químicos

W. F. Almeida
Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com 5 tabelas no texto e as estampas 20 e 21

A grande soma de trabalhos publicados nos últimos anos evidenciou algumas feições inteiramente novas do que hoje podemos chamar complexo vitamínico B₁₂. A mais notável é a existência de várias substâncias estruturalmente parecidas com a vitamina B₁₂, mas dotadas de atividades biológicas variadas, conforme mostra o esquema seguinte (tabela 1), baseado na classificação proposta por BERNHAUER & FRIEDRICH (4).

Outro característico destas substâncias é a atividade biológica em quantidades muito pequenas, de tal modo que só com métodos biológicos extremamente sensíveis é possível revelar sua distribuição em natureza.

Dêstes estudos resultou a verificação de que tais substâncias se encontram em quase todos os seres vivos, excluindo-se apenas os vegetais superiores, onde sua presença não tem sido confirmada.

A verificação de que as cianocobalaminas são indispensáveis para o desenvolvimento de grande número de seres vivos, desde euglenas (10, 14) e outras clorófitas (2, 12, 13) até aves (15) e mamíferos (1, 11) ampliou sua importância biológica, até então suposta ser restrita à atividade anti-anêmica.

Há uma tendência para se considerar o complexo vitamínico B₁₂ essencial à vida por condicionar a formação de núcleo-proteínas, sem as quais as células não se desenvolvem, nem se reproduzem (19).

Interessados em problemas relativos à nutrição dos ruminantes, resolvemos fazer determinações do complexo B₁₂ em material do rumen e nas fezes de bovinos submetidos a várias condições de alimentação. Como é bem conhecido, o rumen contém um grande número de microrganismos, de cuja atividade resulta uma série de operações bioquímicas, essenciais à nutrição dos ruminantes. Concomitantemente com tais reações, os microrganismos produzem

(*) Recebido para publicação em 28 de dezembro de 1958.

grande número de metabolitos, destacando-se entre êles o complexo vitamínico B₁₂.

MATERIAL E TÉCNICA

Foram utilizados para o presente trabalho lotes de vacas leiteiras e de bois em engorda submetidos a diferentes regimes alimentares, por períodos sempre maiores do que 1 mês. Os animais eram de raça Zebu, com exceção das vacas de Campinas, de raça Holandesa.

TABELA 1
Complexo vitamínico B₁₂ (*)

Grupo Geral	Designações comuns	Composição química	Atividade biológica em relação a			
			<i>Escherichia coli</i> 113-3	<i>Lact. leishm.</i>	<i>Euglena gracilis</i>	ação anti-anemia perniciosa
Benzimidazol-cobalaminas	Vitamina B ₁₂ , α-cobalamina	5,6 - dimetil-benzimidazol-cobalamina	+	+	+	+
	Vitamina B ₁₂ biossintética	5 - metil-benzimidazol-cobalamina	+	+	?	?
		benzimidazol-cobalamina	+	+	?	?
Purino-cobalaminas	β-cobalamina, Vit. B ₁₂ - f, Vit. B ₁₂ - fator IV	Adenina-cobalamina	+	+	+	0
	ω-cobalamina, Vit. B ₁₂ - m, Vit. B ₁₂ - fator A	2 - metil-adenina-cobalamina	+	+	+	0
	Vit. B ₁₂ - fator G	Hipoxantina-cobalamina	+	+	?	?
	Vit. B ₁₂ - fator H	2 - metil-hipoxantina-cobalamina	+	+	?	?

(*) Segundo BERNHAUER & FRIEDRICH (4).

MANUTENÇÃO E ALIMENTAÇÃO DOS ANIMAIS — As vacas leiteiras foram mantidas em regime de semi-confinamento, ficando no pasto durante o dia e recolhidas ao estábulo à noite. Os bois em engorda, entretanto, estiveram em regime de confinamento completo.

A ração de alguns dos lotes (tabelas 2 e 3) foi adicionado um suplemento protéico, mineral e vitamínico, constituído por torta de algodão, farelinho de trigo, melaço, farinha de ossos, sais minerais e vitaminas A e D, estabilizadas. Este suplemento apresentava a seguinte composição, por kg:

Proteínas	241,0 g
Gorduras	52,0 g
Extrato livre de nitrogênio ...	401,0 g
Fibra	79,0 g
Resíduo mineral fixo	91,0 g
Umidade	80,0 g
Cálcio (em Ca)	12,4 g
Fósforo (em P ₂ O ₅)	65,0 g
Cloretos (em NaCl)	12,0 g
Ferro (em Fe)	126,5 mg
Cobalto (em Co)	10,5 mg
Cobre (em Cu)	14,9 mg
Magnésio (em Mg)	200,0 mg
Manganês (em Mn)	49,5 mg
Vitamina A	30.000 U. I.
Vitamina D ₂	800 U. I.

COLETA E CONSERVAÇÃO DAS FEZES — Foram coletadas fezes recém-eliminadas, ou após terem permanecido 24 horas no pasto. As fezes, após adição de formol a 40%, gota a gota, na proporção aproximada de 2 ml para cada 100 g de material, e acondicionamento em latas de fechamento hermético, eram imediatamente remetidas ao laboratório e dessecadas a vácuo, à temperatura ambiente, 24 a 30 horas após a coleta. Após a secagem, o material era conservado em sacos de matéria plástica.

COLETA E CONSERVAÇÃO DO MATERIAL DO RUMEN — Logo após o abate, o rumen era retirado e aberto, sendo colhidas amostras em diferentes pontos do órgão, procedendo-se, logo a seguir, à determinação do pH, no material homogeneizado.

Uma parte do material, destinada à contagem de ciliados, era diluída a 50% (v/v) com formol a 10%. O restante era imediatamente resfriado a cerca de 2° C e remetido, em garrafas-térmicas, para o laboratório. Aí, no máximo após 24 horas da coleta, procedia-se ao dessecamento a vácuo, à temperatura ambiente. O material seco era conservado em sacos de plástico.

CONTAGEM DOS CILIADOS DO RUMEN — O material, fixado em formol, era homogeneizado por agitação, sendo a contagem dos ciliados efetuada em hemocítômetro.

DOSEAMENTO DA VITAMINA B₁₂ — Utilizamos o método dos cilindros em placa, empregando a *Escherichia coli*, mutante 113-3 de DAVIS e MINGIOLI (9), vitamina B₁₂ dependente (fig. 1). Este germe desenvolve-se bem em meios sintéticos e apresenta grande sensibilidade a baixas concentrações de vitamina B₁₂ (5, 6, 7, 9).

Os coeficientes de difusão da vitamina B₁₂ (5,6-dimetil-benzimidazolcobalamina) e do fator das fezes ativo para a *Escherichia coli* 113-3 são aproximadamente os mesmos (8). A metionina também pode permitir o crescimento da *E. coli* 113-3 desde que em dose 50.000 vezes maior do que a da vitamina B₁₂ (6), mas os halos de crescimento neste caso têm aspecto difuso e fraco (18). Do mesmo modo que a vitamina B₁₂, mas não a metionina, a atividade das fezes é destruída pela autoclavagem a 120° C por 15 minutos em pH 11,6 (8).

Preparo do inóculo — A cultura de *E. coli* 113-3 é mantida em meio inclinado de ágar-glicosado. Após crescimento por 24 horas a 37° C, pode ser guardada em geladeira por alguns dias.

Para preparo do inóculo, a cultura de um tubo é dispersada em 10 ml de solução fisiológica estéril, sendo a suspensão imediatamente utilizada ou então transferida para um tubo de ensaio esterilizado, podendo ser utilizada dentro de algumas horas. Não há necessidade de lavar a suspensão de germes.

Preparo do meio de cultura — O meio de cultura, adaptado do método turbidimétrico de BURKHOLDER (6), eliminando os amino-ácidos, com exceção da asparagina, é preparado do seguinte modo:

Sulfato de magnésio (+ 7 H ₂ O) .	0,2 g
Fosfato bi-potássico	14,0 g
Citrato de sódio (+ 3 H ₂ O)	1,0 g
Fosfato mono-potássico	6,0 g

Sulfato de amônio	2,0 g
Asparagina	4,0 g
Água destilada, q. s. p.	1 litro

Esteriliza-se em autoclave a 115° C por 15 minutos. A seguir, adicionam-se asépticamente 40 ml de glicose a 50%, esterilizada, a parte, a 110° C por 15 minutos.

O meio de cultura, ainda quente, é distribuído em placas de Petri de 2x10 cm, esterilizadas, na quantidade de 20 ml por placa. Deixa-se solidificar em superfície horizontal. Antes da utilização, o meio já pronto é mantido a 37° C por 24 a 48 horas, para desidratação parcial a fim de facilitar a adição do germe de prova.

No momento de usar, distribue-se com agitação discreta, pela superfície do meio de cultura, 1 ml da suspensão de germes recém-preparada. Após cerca de 5 minutos de repouso, esgota-se o líquido excedente. Deixa-se a placa inclinada até completa secagem de sua superfície (cerca de 15 minutos).

Após a secagem, seis cilindros de vidro ou de aço do tipo usado para o doseamento microbiológico de penicilina são colocados em cada placa, com intervalo angular aproximado de 60° e distantes 2,8 cm do centro da placa. Os cilindros de vidro devem ser ligeiramente aquecidos para que fiquem bem fixos, mas sem afundar. Os cilindros podem ser substituídos por discos de papel de filtro (18).

Preparo das soluções-padrão — Utilizamos vitamina B₁₂ cristalina, fazendo-se soluções com 25, 50 e 100 milimicrogramas por ml. As soluções devem ser feitas em solução tampão de fosfatos, a pH 6,0 (K₂HPO₄ — 0,4 g, KH₂PO₄ — 1,6 g, H₂O — 100 ml).

Estas soluções podem ser preparadas a partir de solução mais concentrada e padronizada.

Preparo do material a dosar — O material a ser dosado deve ser convenientemente dissolvido em solução tampão de fosfatos a pH 6,0, com 0,1% de cianeto de sódio. A diluição a ser feita com o material depende do seu teor aproximado em vitamina B₁₂, devendo ser preparadas soluções que contenham cerca de 50 a 100 milimicrogramas de vitamina B₁₂ por ml.

Se o material a dosar não for completamente solúvel, como é o caso do material do rumen e das fezes, deve ser previamente triturado para depois ser pesado e disperso na solução tampão de fosfatos pH 6,0, com 0,1% de NaCN. Este material deverá ser mantido em vapor fluente por 30 minutos, para extração da vitamina B₁₂.

Doseamento propriamente dito — Em 3 cilindros alternados são colocadas as soluções-padrão, contendo respectivamente 25, 50 e 100 milimicrogramas de vitamina B_{12} por ml. Nos 3 cilindros restantes é colocada a solução do material a dosar.

Em vez de três cilindros com soluções-padrão, podem ser utilizados apenas dois, respectivamente, com 50 e 100 milimicrogramas de vitamina por ml. Neste caso, os quatro cilindros restantes receberão as soluções a serem dosadas (fig. 2).

Cada doseamento deve ser feito, no mínimo, em duplicata.

Incuba-se a 37°C por 24 horas. Em seguida medem-se os diâmetros dos halos de crescimento e calcula-se a média aritmética para cada solução-padrão e para a solução da amostra a dosar.

Em papel semi-logarítmico, determina-se uma reta-padrão, marcando-se as concentrações de vitamina B_{12} padrão, em abscissas (escala logarítmica), e a média do diâmetro dos halos de crescimento, em ordenadas (escala aritmética).

Os valores dos diâmetros médios dos halos de crescimento correspondentes à solução a dosar são levados a essa reta-padrão, lendo-se, no eixo das abscissas, a concentração correspondente de vitamina B_{12} . Este valor, multiplicado pelo título da diluição da amostra, dá o teor de vitamina B_{12} no material em ensaio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ATIVIDADE VITAMÍNICA B_{12} NAS FEZES DE BOVINOS — O teor de complexo vitamínico B_{12} nas fezes recém-emittidas de bovinos dependeu diretamente do tipo de alimentação a que estavam submetidos os animais.

Em vacas zebus, que só dispunham de pasto, a atividade vitamínica B_{12} nas fezes foi, em média, de 31 mcg de vitamina B_{12} por 100 g de material seco; entretanto, um lote semelhante, porém, com adição diária à ração de 1 kg de torta de algodão por animal, já apresentou um teor vitamínico B_{12} de 130 mcg/100 g.

Os resultados apresentados neste trabalho referem-se sempre ao teor de vitamina B_{12} nas substâncias dessecadas, a fim de eliminar as variações devidas ao teor maior ou menor de umidade nos diferentes materiais.

Uma segunda experiência foi feita com vacas holandesas, alimentadas com capim gordura e guandu (fôlhas, flores e frutos). A adição de um suplemento alimentar rico em proteínas, sais minerais e vitaminas fez com que a atividade vitamínica B_{12} das fezes passasse de 132 para 247 mcg/100 g.

Uma terceira experiência foi feita com 3 lotes de bois em engorda, submetidos a confinamento total, tendo como ração básica cana desintegrada, e recebendo um suplemento protéico, mineral e vitamínico, nas quantidades de 1,3 — 2,3 e 4 kg por dia. Os teores observados de vitamina B₁₂ nas fezes desses bovinos foram, respectivamente, de 162, 208 e 267 mcg/100 g.

TABELA 2

Relação entre o tipo de alimentação de bovinos e o teor de complexo vitamínico B₁₂ nas fezes.

Alimentação		Vitamina B ₁₂ nas fezes (mcg/100 g)	Localidade	Obs.
Tipo	Quantidade diária por animal			
Inv.	ad lib.	31	Matão	Vacas zebus
Inv. + T. A.	ad lib. 1 kg.	130	Matão	idem
G. + Gdu.	ad lib. ad lib.	132	Campinas	Vacas holand.
G. + Gdu. + Supl.	ad lib. ad lib. ad lib. 6 kg	247	Campinas	idem
Ca. + Supl.	ad lib. (20 a 22 kg) 1,3 kg	162	Matão	bois zebus
Ca. + Supl.	ad lib. (20 a 22 kg) 2,3 kg	208	Matão	idem
Ca. + Supl.	ad lib. (20 a 22 kg) 4 kg	267	Guataparará	idem
Sab. + Supl.	ad lib. (6 a 7 kg) 3 kg	167	São Carlos	idem

Legenda: Inv. = internada comum, T. A. = torta de algodão, G. = capim gordura, Gdu. = Guandu (fólias, flores e frutos), Sab. = sabugo triturado, Ca. = cana desintegrada, Supl. = suplemento, ad lib. = "ad libitum".

Foi também executada uma experiência de engorda de bois em confinamento total, com alimentação de sabugo de milho triturado e 3 kg por dia do suplemento. Este lote apresentou um teor de vitamina B₁₂ nas fezes de 167 mcg/100 g.

O teor de complexo vitamínico B₁₂ encontrado por BENTLEY & col. (3) — 152 mcg/100 g —, em fezes de bois alimentados com suplementos ricos em micro-elementos, especialmente em cobalto, é da mesma ordem de grandeza de alguns dos nossos resultados.

Nas fezes, após sua emissão, pode continuar o desenvolvimento de microrganismos capazes de sintetizar a vitamina B₁₂; isto explica o aumento do teor do complexo B₁₂ nesses materiais (tabelas 3 e 4) principalmente quando não expostos à chuva, ou ao calor solar intenso.

TABELA 3

Atividade vitamínica B₁₂ em fezes recentes e fezes antigas de bovinos.

Alimen- tação	Ativ. vit. B ₁₂ nas fezes (mcg/100 g mat. seco)		Teor de umidade das fezes		Localidade
	recentes	após 24 horas	recentes	após 24 horas	
Inv.	31	118	82%	44%	Matão
G. + G du.	132	205	81%	57%	Campinas
Sab. + Supl.	167	193	75%	72%	São Carlos

Legenda: Inv. = internada comum, G. = capim gordura, Gdu. = guandu (fólias, flôres e frutos), Sab. = sabugo triturado, Supl. = suplemento.

Procedemos também a determinações da atividade vitamínica B₁₂ em fezes de bois mantidos em jejum por um número variável de dias. Esses animais haviam sido previamente engordados por cerca de 5 meses com sabugo de milho triturado, mantido sempre no cocho à disposição dos animais, recebendo também 3 kg de “suplemento” por boi e por dia. Durante o período de jejum a água foi deixada à vontade. Nas fezes dos animais em jejum houve pequena variação do teor de complexo B₁₂ (tabela 4).

TABELA 4

Atividade vitamínica B₁₂ em fezes de bois em jejum

Dias de jejum	FEZES		Localidade
	recentes	após 24 horas	
	(mcg vit. B ₁₂ / 100 g mat. seco)		
0	167	193	São Carlos
1	190	223	São Carlos
2	165	213	São Carlos
3	150	175	São Carlos

Notas —

- 1) Regime alimentar prévio: sabugo triturado, a vontade (cêrca de 6 kg/boi/dia) e “suplemento” (3 kg/boi/dia).
- 2) Durante o jejum os animais tiveram água à disposição.

ATIVIDADE VITAMÍNICA B₁₂ NO RUMEN — Reunimos na tabela 5 os valores obtidos com o material retirado do rumen, após o abate de bois que se encontravam em regime de engorda há alguns meses. Antes do abate, os animais foram mantidos em jejum por tempo variável.

Os bois mantidos em jejum por 1, 2 e 3 dias haviam sido engordados, em confinamento total, com sabugo de milho e “suplemento” e, durante o jejum, tiveram água à disposição. Os animais mantidos em jejum por 5 dias eram provenientes de internadas do interior do Estado de São Paulo e viajaram por ferrovia até a Capital antes do abate, por isso, foram também privados de água durante o jejum.

Verificámos uma queda acentuada do teor de complexo B₁₂ do rumen com o aumento do número de dias de jejum (tabela 5 e gráfico 1). Assim, o complexo B₁₂ baixou de cêrca de 550 mcg/100 g, no 1.º dia de jejum, para 105 mcg/100 g, no 2.º dia, e para 91 mcg/100 g, no 3.º dia.

Nos animais alimentados em internadas comuns e depois mantidos em jejum por 5 dias, sem água, o complexo B₁₂ chegou a cêrca de 30 mcg por 100 g de material seco.

Estes resultados mostram que os processos bioquímicos que levam à produção do complexo vitamínico B₁₂ no rumen se ressen-

tem fortemente da falta de substratos proporcionados pelos alimentos, diminuindo a atividade vitamínica B_{12} no rumen acentuadamente já nos primeiros dias de jejum.

TABELA 5

Influência do jejum sobre a atividade vitamínica B_{12} , pH e ciliados do rumen de bois.

Dias de jejum	Pêso médio antes do jejum	Perda de pêso	Vitamina B_{12}	pH do rumen	Ciliados do rumen	Alimentação anterior
	(kg)		(mcg/100g)		(n.º/ml)	
1	535	4,3%	549	7,4	14.600	} Sabugo e "Suplemento"
2	555	12,8%	105	7,9	5.300	
3	565	14,3%	91	7,9	1.700	
5	—	—	34	9,0	0	Invernada

Nota: Cada resultado representa a média aritmética dos dados de dois animais.

A literatura consultada sobre o assunto (2, 8, 16) indica níveis de atividade vitamínica B_{12} variando entre 5 mcg e 380 mcg/100 g. Os nossos dados, demonstrando a influência decisiva do número de dias de jejum sobre o teor de complexo vitamínico B_{12} do rumen, parecem esclarecer a razão da existência de valores tão diferentes.

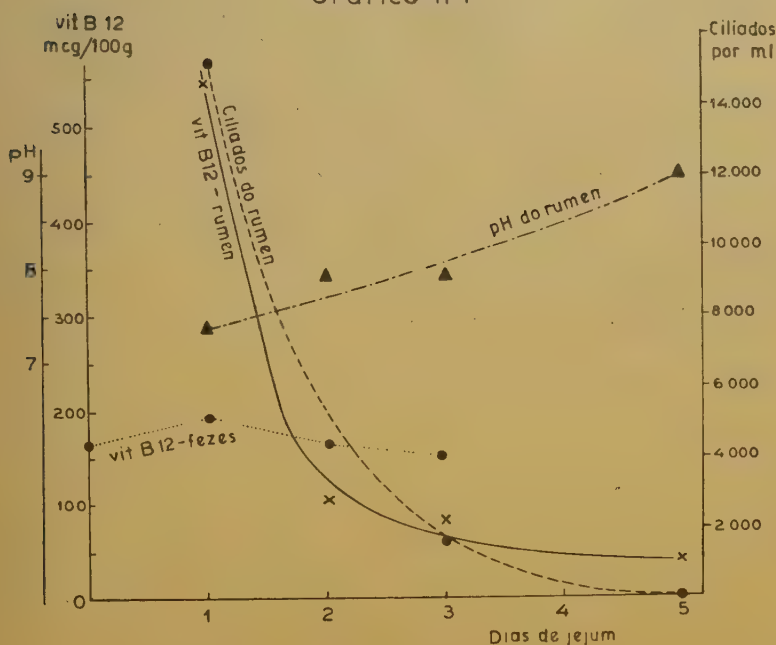
O comportamento diferente da atividade vitamínica B_{12} nas fezes e no rumen de bovinos durante o jejum parece indicar haver pelo menos dois locais de produção do complexo B_{12} no tubo digestivo dos ruminantes; um no rumen e outro no intestino grosso.

CILIADOS DO RUMEN — O exame de material de rumen de bovinos, colhido em matadouro, onde os animais são abatidos após 5 dias de viagem e conseqüente jejum, mostra uma ausência praticamente

te completa de protozoários ciliados, que são característicos do rumen desses animais.

Resolvemos, por isso, proceder à contagem dos referidos ciliados em material de rumen de bois abatidos após um número variável de dias de jejum. Isto foi feito com animais submetidos a regime de engorda com sabugo de milho triturado e com o suplemento já assinalado, por serem esses os animais de que dispúnhamos para tais verificações.

Gráfico nº1



Observamos uma diminuição progressiva e acentuada do número de protozoários ciliados com o aumento do número de dias de jejum (tabela 5). No gráfico 1 podemos verificar que essa queda do número de ciliados acompanha a diminuição da atividade vitamínica B₁₂ ao passo que o pH do rumen se eleva.

CONSIDERAÇÕES SÔBRE A PRODUÇÃO E A ELIMINAÇÃO DE VITAMINA B_{12} NOS RUMINANTES — Com base em nossas observações, um boi produz no rumen cerca de 4,3 vezes mais vitamina B_{12} do que a quantidade eliminada pelas fezes, diariamente.

Para um cálculo aproximado, consideramos um animal de 500 kg com 100 litros de material de rumen, contendo 6 kg de sólidos com 5,5 mg de vitamina B_{12} por kg, o que representa um total de 33 mg de vitamina B_{12} produzida diariamente, uma vez que a renovação do material do rumen se processe cada 24 horas.

Os animais destas experiências eliminaram cerca de 18 kg de fezes por dia com 25% de sólidos, contendo 1,7 mg de vitamina B_{12} por kg, ou seja, um total de 7,6 mg desta vitamina, o que praticamente representa o total diário excretado, uma vez que a eliminação urinária é muito pequena (17).

Portanto, apenas a quantidade produzida pelo rumen é cerca do quádruplo da eliminada pelas fezes, sem considerar a produção no intestino grosso, que é independente da do rumen, como foi demonstrado por sua persistência durante o jejum.

A quantidade de vitamina B_{12} ingerida com os alimentos praticamente não interfere nestes cálculos por ser muito pequena, pois é cerca de 40 a 55 vezes menor do que o teor eliminado (17). O teor armazenado no fígado (1 mg/kg) e nos músculos (0,1 mg/kg) é de cerca de 15 mg, o que representa a quantidade produzida pelo rumen em apenas 12 horas.

A produção de vitamina B_{12} pelo rumen, muito acima da quantidade excretada, permite supôr sua grande utilização no metabolismo dos ruminantes, ao contrário do que sucede no homem, cujas necessidades diárias são da ordem de 2 mcg. Outra hipótese, alternativa ou concomitante, a respeito dêste assunto, poderia ser a destruição acentuada, no trânsito até o intestino grosso, de grande parte da vitamina B_{12} produzida pelo rumen.

RESUMO

A atividade vitamínica B_{12} foi determinada em material do rumen e em fezes de bovinos pelo método dos cilindros-em-placa, usando a *Escherichia coli* — mutante 113-3 — como germe de prova (figs. 1 e 2). No material de rumen foi também determinado o pH e foram contados os protozoários ciliados.

O teor de complexo vitamínico B_{12} em fezes de bois e de

vacas variou com o tipo de alimentação do gado, desde cerca de 250 mcg de vitamina B₁₂ por 100 g de material seco, nos animais submetidos a alimentação intensiva, até cerca de 30 mcg/100 g, nos de internada comum (tabela 2). Entretanto, o jejum por 1, 2 e 3 dias (com administração de água) não acarretou variação apreciável da atividade vitamínica B₁₂ nas fezes recém-eliminadas (tabela 4).

Após a eliminação das fezes, seu teor em complexo B₁₂ aumentou sensivelmente, indicando tal fato a continuação dos processos fermentativos que o produzem (tabela 3).

O jejum acarretou diminuição nítida da atividade vitamínica B₁₂ no rumen, baixando de 549 mcg/100 g (com 1 dia de jejum) até 34 mcg/100 g (com 5 dias de jejum). A queda foi mais acentuada do 1.º para o 2.º dia de jejum (tabela 5 e gráfico 1).

O fato de o jejum fazer baixar acentuadamente o teor de complexo vitamínico B₁₂ no rumen, mas não nas fezes, parece indicar existirem dois locais independentes de produção do complexo B₁₂ no tubo digestivo dos bovinos: um no rumen e outro no intestino grosso.

A reação do rumen, à medida que o jejum se prolonga, sofre nítida inclinação para o lado alcalino, atingindo a pH 9 após 5 dias de jejum (tabela 5 e gráfico 1).

Simultaneamente com as alterações bioquímicas no rumen de bois em jejum, verifica-se uma progressiva redução do número de protozoários. As contagens feitas revelaram a presença de ciliados em número de 14.600/ml, 5.300/ml e 1.700/ml respectivamente após 1, 2 e 3 dias de jejum. Com 5 dias de jejum não mais foram encontrados protozoários no rumen (tabela 5 e gráfico 1).

A quantidade diária de vitamina B₁₂ produzida pelo rumen (33 mg) foi cerca de 4,3 vezes maior do que a quantidade eliminada com as fezes (7,6 mg), sem considerar a produção no intestino grosso, que é independente da do rumen, como foi demonstrado por sua persistência durante o jejum.

Esta produção elevada, sendo a quantidade total armazenada no fígado e nos músculos de apenas cerca de 15 mg, permite supor a existência de um dos processos seguintes, ou de ambos: 1) grande utilização da vitamina B₁₂ no metabolismo dos ruminantes; 2) acentuada destruição da mesma no trânsito do rumen até o intestino grosso.

VITAMIN B₁₂ - ACTIVITY IN BOVINE RUMEN AND FECES. ITS VARIATION ACCORDING THE RATION FED

Abstract

The vitamin B₁₂ - activity was determined in rumen material and bovine feces by the cylinder plate method, using the *Escherichia coli* 113-3 as test microorganism. In the rumen material the pH was determined and the protozoa counted.

The amount of vitamin B₁₂ in the feces of cattle depended upon the ration fed, varying from 250 mcg per 100 g dried material, in intensively fed animals, to 30 mcg/100 g in the ones maintained on common pastures (table 2). However, 1, 2 and 3 fast days (with water available) did not cause appreciable variation of the vitamin B₁₂ - activity in the feces (table 4).

The vitamin B₁₂ - activity increased in the feces laid on pasture; this fact indicates the vitamin B₁₂ fermentative process continuation after the feces elimination (table 3).

During the fast, the rumen vitamin B₁₂ - activity sharply decreased, from 549 mcg/100 g (in the first day) to 34 mcg/100 g (in the fifth day). The sharpest fall was observed from the first to the second day (table 5).

During the fast, the vitamin B₁₂ falls in the rumen contents, but not in the feces, what seems to indicate the existence of two independent places of vitamin B₁₂ production in the cattle digestive tube: one in the rumen and another in the large intestine.

Rumen reaction turned to alkalinity with the fast, going to pH 9 in 5 days (table 5).

There was a progressive reduction of the rumen protozoa number, simultaneously with the rumen biochemical changes. These determinations showed 14,600/ml, 5,300/ml and 1,700/ml after 1, 2 and 3 fast days, respectively. After 5 fast days no more protozoa were found in the rumen (table 5).

The daily quantity of vitamin B₁₂ produced by the rumen (33 mg) was about 4.3 times bigger than that one eliminated by the feces (7.6 mg); besides there is the vitamin B₁₂ production in the large intestine.

This vitamin B₁₂ production, much higher than the excreted quantity, indicates one or both of the following hypotheses: 1) a large utilization of this vitamin in the ruminant metabolic process; 2) a significant destruction of vitamin B₁₂ in the transit from the rumen to the large intestine.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — ABELSON, P. M. & DARBY, H. H. — 1949 — The synthesis of vitamin B₁₂ in the digestive system of the sheep. *Sci.*, **110** (2864): 566.
- 2 — BARBER, F. W., BAILE, D. L., TROESCHER, C. B. & HUHTANEN, C. N. 1953 — Preliminary studies of the response of a Chrysomonad to Vitamin B₁₂ and related substances. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **56** (5): 863-69.
- 3 — BENTLEY, O. G., MOINUDDIN, M., HERSHBERGER, T. V., KLOSTERMAN, E. W. & MOKON, L. — 1954 — The effect of trace minerals on growth performance and vitamin B₁₂ synthesis of steers. *J. Animal Sci.* **13**: 789-801.
- 4 — BERNHAUER, K. & FRIEDRICH, W. — 1954 — Über die Vitamine der B₁₂ Gruppe, *Angew. Chem.*, **66** (24): 776-80.
- 5 — BESSELL, C. J., HARRISON, E. & LEES, K. A. — 1950 — Assay of vitamin B₁₂ with a mutant of *Escherichia coli*. *Chemistry & Industry*, n.º 28:561.
- 6 — BURKHOLDER, P. R. — 1951 — Determination of vitamin B₁₂ with a mutant strain of *Escherichia coli*. *Sci.*, **114** (2966): 459-60.
- 7 — CHIAO, J. S. & PETERSON, W. H. — 1953 — Microbiological assay of vitamin B₁₂ with a mutant strain of *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol.*, **1** (1): 42- 6.
- 8 — COATES, M. E., FORD, J. E., HARRISON, G. F., KON, S. K. & PORTER, J. W. G. — 1951 — Vitamin B₁₂ activity for chicks and different microorganisms of gut content and feces. *Biochem. J.*, **49**: lxxvii-lxxviii.
- 9 — DAVIS, D. E. & MINGIOLI, E. S. — 1950 — Mutants of *Escherichia coli* requiring methionine or vitamin B₁₂. *J. Bact.*, **60**: 17-28.
- 10 — HENDLIN, D. — 1953 — Discussion of the Papers on Vitamin B₁₂. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **56** (5): 870-72.
- 11 — HESTER, A. S. & WARD, G. E. — 1954 — Vitamin B₁₂ feed supplement — a staff-industry collaborative report. *Ind. Eng. Chem.*, **46** (2): 238-43.
- 12 — HUTNER, S. H., PROVASOLI, L. & FILFUS, J. — 1953 — Nutrition of some Phagotrophic Fresh-Water Chrysomonads. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **56** (5): 852-62.
- 13 — PROVASOLI, L. & PINTNER, I. J. — 1953 — Ecological Implications of "in vitro" nutritional requirements of algal flagellates. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **56** (5): 839-51.
- 14 — ROBBINS, W. J., HERVEY, A. & STEBBINS M. E. — 1953 — *Euglena* and Vitamin B₁₂. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **56** (5): 818-30.

- 15 — RUBIN, M. & BIRD, H. R. — 1946 — A chick growth factor in cow manure. I — Its non-identity with chick growth factors previously described. *J. Biol. Chem.*, **163**: 387-92.
- 16 — SMITH, E. L. — 1951 — Vitamin B₁₂ Part. 1. *Nutrition Abstr. and Rev.*, **20** (4): 795-809.
- 17 — TEERI, A. E., ENOS JR., H. F., POMERANTZ, E. & COLOVOS, N. F. — 1955 — The excretion of vitamin B₁₂ by dairy cattle. *J. Animal Sci.*, **14**: 268-71.
- 18 — WILLIAMS, W. L., ESPOSITO, R. G. & PIERCE, J. V. — 1952 — A rapid simplified microbiological assay method for vitamin B₁₂ and other vitamins. *Fed. Proc.*, **11**: 458.
- 19 — ZUCKER T. F. & ZUCKER, L. M. — 1950 — "Animal protein factor" and Vitamin B₁₂ in Nutrition of animals. *Vitamins and Hormones*, **8**: 1-54. Acad. Pres. Inc., New York.

EXPLICAÇÃO DAS ESTAMPAS:

Estampa 20

Fig. 1 — Placa demonstrativa dos halos de crescimento da *Escherichia coli* 113-3 em presença de diferentes concentrações de vitamina B₁₂.

Fig. 2 — Placa de doseamento de vitamina B₁₂.

A = padrão com 100 mmcg de vitamina B₁₂ por ml.

D = idem, com 50 mmcg/ml.

B, C, E, F = soluções com material de fezes de bovinos.

Estampa 21

Figs. 3 e 4 — Aspectos de alguns dos lotes das experiências em confinamento total.

Fig. 1

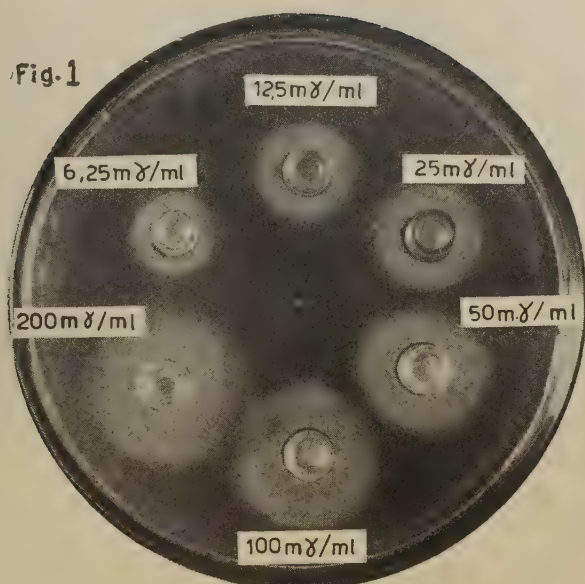
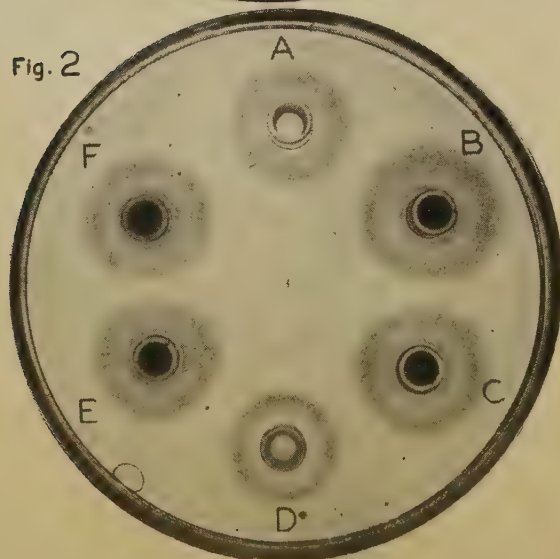


Fig. 2





ESTUDOS SÔBRE O MECANISMO DE AÇÃO DO ALDRIN,
DIELDRIN, ISODRIN E ENDRIN EM
PERIPLANETA AMERICANA (L.) (*)

POR

O. Giannotti

Do Instituto Biológico de São Paulo

Com 3 tabelas no texto

Em 1956, GIANNOTTI, METCALF e MARCH (1) demonstraram que o Aldrin, aplicado por contato em baratas *Periplaneta americana* (L.), acumula-se no tecido gorduroso desse inseto e é parcialmente convertido para Dieldrin.

O presente trabalho contém os resultados obtidos em estudos posteriores, onde foi investigada a existência desses inseticidas em outros tipos de tecidos da barata, tais como: tubo digestivo, músculos e cutícula juntamente com o tecido nervoso. Além disso, estendemos nossas observações com relação aos inseticidas Isodrin e Endrin, que, do ponto de vista químico, são estereoisômeros dos dois primeiros. Finalmente, com o objetivo de estudar "in vitro" essa conversão, realizamos alguns ensaios de incubação, utilizando apenas o Isodrin.

MATERIAL E TÉCNICA

Os inseticidas empregados nos foram cedidos pela Shell Chemical Corporation, por intermédio do Dr. R. B. METCALF, do Departamento de Entomologia, da Universidade da Califórnia, Riverside, a quem agradecemos.

Para a separação e caracterização dos inseticidas, utilizamos essencialmente a mesma técnica originalmente descrita por GIANNOTTI, METCALF e MARCH (1), ou seja, da cromatografia ascendente em papel, e posterior localização das áreas contendo os inseticidas por meio de ensaios biológicos, empregando larvas do mosquito *Culex quinquefasciatus* SAY, no 3.^o instar.

Durante o desenvolvimento das experiências, verificamos que, estendendo-se o período de determinação da mortalidade das larvas de mosquitos de 24 para 48 horas, nos foi possível, sem prejuízo da técnica, fazer observações extremamente interessantes principalmente no que respeita ao metabolismo do Isodrin.

(*) Recebido para publicação em 27 de dezembro de 1958.

Para preparar os extratos a serem cromatografados, 5 a 8 fêmeas intoxicadas com Aldrin ou Isodrin foram dissecadas, separando-se de cada uma, e da melhor forma possível, o tubo digestivo, os músculos, o corpo gorduroso e a cutícula juntamente com o tecido nervoso. A homogeneização e extração desses tecidos foram idênticas a da técnica original, a não ser no caso dos extratos dos tubos digestivos e dos músculos, onde o extrato de éter de petróleo não apresenta resíduo oleoso, podendo, portanto, ser diretamente utilizado para a cromatografia.

Para os estudos de incubação, empregamos a mesma técnica utilizada por METCALF e MARCH (4), isto é, as diferentes partes de cada barata foram colocadas em 2,9 ml da solução tampão fosfatada de Krebs-Ringer (UMBREIT e col., 1949) pH = 7,2 e contendo glucose a 0,01 M; a seguir, adicionamos 0,1 ml de álcool contendo 20 γ de Isodrin, procedendo-se então à oxigenação por 5 minutos e finalmente a incubação, que durou cerca de 4 horas a 37° C. Terminada esta, todo o material foi homogeneizado e extraído de acordo com a técnica já descrita e, finalmente submetido à cromatografia em papel.

RESULTADOS OBTIDOS E DISCUSSÃO

Os dados obtidos acham-se resumidos nas tabelas de I a III. Quanto aos insetos tratados com Aldrin (tab. I), verifica-se que, além do que já havia sido constatado anteriormente, isto é, presença desse inseticida no tecido gorduroso do inseto juntamente com sua forma "epoxi" Dieldrin, ocorre também o mesmo fato com os outros tipos de tecidos, isto é, tubo digestivo, músculos e cutícula + tecido nervoso. É interessante realçar que os dados obtidos indicam que a quantidade de Aldrin nos músculos é muito pequena, predominando, neste caso, o Dieldrin.

No que respeita aos insetos tratados com Isodrin, é necessário primeiramente observar o que se verifica com as amostras do inseticida acima referido e também do Endrin, utilizadas nesta experiência. Constata-se (tab. II — 3.^a coluna) que o Isodrin localiza-se quase que totalmente na seção 2 da tira de papel e, portanto, com um *rf* igual ao do Aldrin, isto é, 0,2.

Entretanto, na cromatografia de uma mistura das amostras de Isodrin e Endrin (tab. II — 4.^a coluna), além da seção 2 da tira de papel, também as de número 5-6-7 e 9-10 se mostraram tóxicas às larvas de mosquitos, evidenciando que a amostra de Endrin é

constituída de 2 componentes tóxicos, um com $rf = 0,6$ e outro com $rf = 0,9$, aproximadamente.

Tab. I — Cromatografias do Aldrin e Dieldrin e de extratos de diferentes tipos de tecidos de baratas *Periplaneta americana* (L.) intoxicadas com Aldrin. Localização dos inseticidas por meio de ensaios biológicos com larvas de mosquitos no 3º "instar"

Nº da secção do papel	Distância da origem em cm	% de mortalidade depois de 48 horas				
		Aldrin 3 μ Dieldrin 3 μ	Extratos de diferentes tecidos de baratas intoxicadas com Aldrin 8 $\frac{1}{g}$			
			tecido gorduroso	tubo digestivo	músculos	cutícula + sist. nerv.
1	1,5	30	0	0	20	10
2	3,0	100	100	80	20	80
3	4,5	0	10	20	0	20
4	6,0	60	0	0	0	0
5	7,5	100	100	30	10	100
6	9,0	100	100	80	100	100
7	10,5	0	0	0	10	0
8	12,0	0	0	0	0	0
9	13,5	0	0	0	30	0
10	15,0	0	0	0	0	0

Posteriormente, trabalhando com uma outra amostra de Endrin enviado pelo Dr. R. B. METCALF, que não deveria conter outros componentes tóxicos, verificamos que êsse inseticida se apresentava com um $rf = 0,6$, portanto, como era de se esperar, igual ao Dieldrin.

A fração tóxica com $rf = 0,9$ é constituída de outra substância química, de toxicidade mais baixa para as larvas de mosquito, pois a sua presença só é perfeitamente estabelecida quando se leva em consideração a mortalidade dos mosquitos após 48 horas. Aliás, KLEIN, LANG, TIGHE, RAMSEY, MITCHELL e KUNZE (3), em seus trabalhos sobre análise residual de Endrin nos vegetais por processo biológico e sua confirmação por cromatografia em papel, verificaram a existência de impureza em amostras daquele inseticida, cuja toxi-

cidade para a mosca comum é relativamente pequena. Posteriormente, analisamos a amostra de Endrin técnico por nós utilizada pelo mesmo processo empregado por KLEIN e col., e obtivemos a confirmação de tratar-se do mesmo tipo de impureza.

Tab II Cromatografias do Isodrin, Isodrin + Endrin, e de extratos de diferentes tipos de tecidos de baratas, *Periplaneta americana* (L.) intoxicadas com Isodrin
Localização dos inseticidas por meio de ensaios biológicos com larvas de mosquitos no 3º "instar"

Nº da secção do papel	Distância da origem em cm	% de mortalidade depois de 48 horas					
		Isodrin 3γ	Isodrin 3γ + Endrin 3γ	Extratos de diferentes tecidos de baratas intoxicadas com Isodrin 20 γ/g			
				tubo digestivo	tecido gorduroso	músculo	cutícula + sist. nervoso
1	1,5	60	50	0	0	0	0
2	3,0	100	95	100	10	20	40
3	4,5	0	50	70	10	95	95
4	6,0	0	0	0	0	0	10
5	7,5	0	38	30	90	0	0
6	9,0	0	87	40	80	95	50
7	10,5	0	52	0	0	0	10
8	12,0	0	0	27	0	0	0
9	13,5	0	57,3	80	0	0	0
10	15,0	0	42,2	20	0	0	0

Os ensaios biológicos (tab. II), feitos de cromatografias em que foram empregados extratos de tecido gorduroso, dos músculos e da cutícula + sistema nervoso de baratas intoxicadas com 20 γ/g de Isodrin, revelaram, além do Isodrin, demonstrada pela toxicidade das secções 2 e 3 do papel para as larvas de mosquitos, também a presença do Endrin, pela toxicidade, principalmente, da secção 6 da tira de papel. Portanto, da mesma maneira do que o Aldrin, também o Isodrin converte-se em Endrin durante o processo metabólico que sofre no interior do organismo do inseto. Entretanto, é extremamente interessante observar que, feita a cromatografia de extratos preparados a partir de tubos digestivos de baratas intoxicadas com Isodrin, além d'êste inseticida, constata-se a presença de Endrin, como nos casos acima citados, e de mais uma fração tóxica locali-

zada nas secções 9 e 10 da tira de papel, portanto um rf aproximado de 0,9 (coluna 5 da tab. II) o que sugere tratar-se, com muita probabilidade, da mesma impureza encontrada no Endrin técnico.

Tab. III Cromatografias de extratos de diferentes tipos de tecidos de baratas, *Periplaneta americana* (L) incubados com Isodrin. Localização dos inseticidas por meio de ensaios biológicos com larvas de mosquitos no 3º "instar"

Nº da secção do papel	Distância da origem em cm	% de mortalidade depois de 48hs				
		Contrôle ¹⁾	Extratos de diferentes tipos de tecidos de baratas incubados com Isodrin.			
			tecido gorduroso	tubo digestivo	músculos	cutícula + sist. nerv.
1	1,5	0	0	10	5	30
2	3,0	100	100	100	80	80
3	4,5	20	20	55	95	100
4	6,0	0	25	20	0	20
5	7,5	10	0	50	0	0
6	9,0	0	5	55	0	15
7	10,5	0	0	10	0	10
8	12,0	0	0	0	0	0
9	13,5	0	0	0	0	0
10	15,0	0	0	0	0	0

1) Isodrin sem tecido

Os resultados obtidos com as experiências de incubação de tecidos acham-se resumidos na tabela III. Os dados ali contidos evidenciam que, embora as condições empregadas não tenham sido as mais apropriadas para o desenvolvimento da reação, apenas as incubações feitas com o tubo digestivo são capazes de converter parcialmente o Isodrin em Endrin, uma vez que somente nesse caso (tab. III coluna 5) se constatou a toxicidade das secções 5 e 6 da tira de papel para as larvas de mosquitos, que corresponde à localização do Endrin. Entretanto, não se observou a formação da fração tóxica com $rf. = 0,9$.

RESUMO E CONCLUSÕES

Pelas experiências realizadas, pode-se concluir que fêmeas da barata comum, *Periplaneta americana* (L.), são capazes de converter tanto o Aldrin, como já tinha sido verificado em trabalho anterior, (1) como o Isodrin, em suas formas correspondentes "epoxi" Dieldrin e Endrin, durante os processos metabólicos que os dois primeiros inseticidas sofrem no interior do organismo dêsse inseto. Quando os insetos são tratados com Aldrin, não só êste inseticida mas também o Dieldrin são encontrados, de um modo generalizado, em todos os tecidos dos mesmos, isto é, tubo digestivo, tecido gorduroso, músculos e cutícula mais sistema nervoso. Quando os insetos são tratados com Isodrin, verifica-se, da mesma maneira, a existência dêsse inseticida e do Endrin em todos os tipos de tecidos, observando-se, além disso, a existência de uma outra fração tóxica no tubo digestivo, cuja toxicidade para as larvas de mosquito parece ser bem menor do que o Isodrin e o Endrin. Os resultados obtidos pela cromatografia em papel indicam que essa fração tóxica é a mesma encontrada em amostras de Endrin técnico por KLEIN e col. (3). Os ensaios realizados "in vitro", por meio da incubação de diferentes tecidos (tubo digestivo, músculos, tecido gorduroso e cutícula mais sistema nervoso), sugerem que a reação de conversão deve se processar principalmente no tubo digestivo, e os produtos aí formados são distribuídos, posteriormente, por todo o organismo do inseto. A constatação da fração com $rf = 0,9$ no tubo digestivo de insetos intoxicados com Isodrin, cuja toxicidade para as larvas de mosquito parece ser bem menor do que o próprio Isodrin e o Endrin, pode ser interpretada como sendo uma fase intermediária de degradação do Isodrin. Em outras palavras, o Isodrin se converteria primeiramente em Endrin e em seguida nessa fração com $rf = 0,9$, a qual conduziria aos produtos finais de eliminação. Esta hipótese viria reforçar a idéia de HOSKINS e GORDON (2) relativa à conversão do Aldrin para Dieldrin, segundo os quais essa reação representa uma das fases da degradação do Aldrin no interior do organismo do inseto.

STUDIES ON THE MODE OF ACTION OF ALDRIN, DIELDRIN,
ISODRIN AND ENDRIN IN *PERIPLANETA AMERICANA* (L.)*Abstract*

Studies carried out on the mode of action of Aldrin and Isodrin on Periplaneta americana showed that not only Al-

drin, as already was demonstrated (1) but also Isodrin are partially converted to the correspondent "epoxides" forms Dieldrin and Endrin during the metabolic process of the formers insecticides inside the organism of the insects. In both cases, that is, when insects are treated with Aldrin and Isodrin, we will found not only these insecticides but also Dieldrin and Endrin, respectively, in all tissues of the insects, that is: gut, muscles, fat bodies and cuticle + nervous system. In the gut of insects poisoned with Isodrin we found, besides Endrin, other fraction, of unknown nature, apparently less toxic for mosquito larvae than Isodrin and Endrin, and chromatographically with the same characteristic of an impurity found by Klein and others (3) in technical Endrin.

According the incubation experiments, using different tissues of the insects (gut, muscles, fat body and cuticle + nervous system), it appears that the conversion of Aldrin and Isodrin to Dieldrin and Endrin will take place mainly in the gut, being posteriorly distributed all over insect. The interesting possibility suggested by Hoskins and Gordon (2) that Aldrin is not toxic, but is "activated" to the "epoxides" in a step of the degradation process, is better observed in the case of Isodrin, where besides Endrin is found other fraction less toxic to the insects. In other words, Isodrin would be converted to Endrin and later in that fraction, that would lead to the final products of degradation.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — GIANNOTTI, O., R. L. METCALF & R. B. MARCH — 1956 — The mode of action of Aldrin and Dieldrin in *Periplaneta americana* (L.) *Ann. Ent. Soc. Amer.*, 49 (6): 588-92.
- 2 — HOSKINS W. M. & H. T. GORDON — 1956 — Arthropod Resistance to Chemicals. *Annual Rev. Ent.* 1: 89-122.
- 3 — KLEIN A. K., E. P. LANG, J. F. TIGHE, L. L. RAMSEY, L. C. MITCHELL & F. M. KUNZE — 1956 — Biological assay of Endrin in leafy vegetables and its confirmation by paper chromatography. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, 39 (1): 242-53.
- 4 — METCALF R. L. & R. B. MARCH — 1953 — Further studies on the mode of action of organic thionophosphate insecticides. *Ann. Ent. Soc. Amer.*, 46 (1): 63-74.
- 5 — UMBREIT, W. W., R. H. BURRIS & J. F. STAUFFER — 1949 — Manometric techniques and tissue metabolism, 2nd Ed., Burgess Publ. Co., Minneapolis.

Composto e impresso nas
ESCOLAS PROFISSIONAIS SALESIANAS
Alameda Barão de Piracicaba, 560
São Paulo — Brasil